



(51) 国際特許分類6 G01N 33/53, C07K 16/18	A1	(11) 国際公開番号 WO97/34145 (43) 国際公開日 1997年9月18日(18.09.97)																																																																																																																																																																																																																																																																
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/00804 (22) 国際出願日 1997年3月13日(13.03.97) (30) 優先権データ 特願平8/56090 1996年3月13日(13.03.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 三菱化学株式会社 (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION)[JP/JP] 〒100 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 石黒 幸一 (ISHIGURO, Koichi)[JP/JP] 佐藤 一紀 (SATO, Kazuki)[JP/JP] 朴 正美 (PARK, Jun-Mi)[KR/JP] 内田 庸子 (UCHIDA, Tsuneko)[JP/JP] 今堀 和友 (IMAHORI, Kazutomo)[JP/JP] 〒194 東京都町田市南大谷11 株式会社 三菱化学 生命科学研究所内 Tokyo, (JP)		(74) 代理人 弁理士 遠山 勉, 外(TOYAMA, Tsutomu et al.) 〒103 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書																																																																																																																																																																																																																																																																
(54) Title: ANTIPHOSPHORYLATED TAU PROTEIN ANTIBODY AND METHOD FOR DETECTING ALZHEIMER'S DISEASE WITH THE USE OF THE SAME (54) 発明の名称 抗リン酸化タウ蛋白質抗体及びそれを用いるアルツハイマー病の検出方法 (57) Abstract An antibody is prepared by using a partial peptide containing the phosphorylated site of a phosphorylated tau protein in the paired helical filament as an immunogen. Then the reactivity of the antibody thus obtained with samples obtained from individuals with a suspicion of Alzheimer's disease is examined to thereby detect the disease. <div data-bbox="938 1291 1518 1911"><p style="text-align: center;">peptide</p><table border="1"><thead><tr><th></th><th>- PS199</th><th>- PS202</th><th>- PT205</th><th>- PT231</th><th>- PS235</th><th>- rPS235</th><th>- PS262</th><th>- PS396</th><th>- PS404</th><th>- PS413</th><th>- PS422</th><th>- K1</th><th>- K2</th><th>- AK-K3</th><th>- S262</th></tr></thead><tbody><tr><td>anti-PS199</td><td>○</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>anti-PS202</td><td></td><td>○</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>anti-PT205</td><td></td><td></td><td>○</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>anti-PT231</td><td></td><td></td><td></td><td>○</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>anti-PS235</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>○</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>anti-rPS235</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>○</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>anti-PS262</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>○</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>anti-PS396</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>○</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>anti-PS404</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>○</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>anti-PS413</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>○</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>anti-PS422</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>○</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>anti-K1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>○</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>anti-K2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>○</td><td></td><td></td></tr><tr><td>anti-AK-K3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>○</td><td></td></tr><tr><td>anti-S262</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>○</td></tr></tbody></table></div>				- PS199	- PS202	- PT205	- PT231	- PS235	- rPS235	- PS262	- PS396	- PS404	- PS413	- PS422	- K1	- K2	- AK-K3	- S262	anti-PS199	○															anti-PS202		○														anti-PT205			○													anti-PT231				○												anti-PS235					○											anti-rPS235						○										anti-PS262							○									anti-PS396								○								anti-PS404									○							anti-PS413										○						anti-PS422											○					anti-K1												○				anti-K2													○			anti-AK-K3														○		anti-S262															○
	- PS199	- PS202	- PT205	- PT231	- PS235	- rPS235	- PS262	- PS396	- PS404	- PS413	- PS422	- K1	- K2	- AK-K3	- S262																																																																																																																																																																																																																																																			
anti-PS199	○																																																																																																																																																																																																																																																																	
anti-PS202		○																																																																																																																																																																																																																																																																
anti-PT205			○																																																																																																																																																																																																																																																															
anti-PT231				○																																																																																																																																																																																																																																																														
anti-PS235					○																																																																																																																																																																																																																																																													
anti-rPS235						○																																																																																																																																																																																																																																																												
anti-PS262							○																																																																																																																																																																																																																																																											
anti-PS396								○																																																																																																																																																																																																																																																										
anti-PS404									○																																																																																																																																																																																																																																																									
anti-PS413										○																																																																																																																																																																																																																																																								
anti-PS422											○																																																																																																																																																																																																																																																							
anti-K1												○																																																																																																																																																																																																																																																						
anti-K2													○																																																																																																																																																																																																																																																					
anti-AK-K3														○																																																																																																																																																																																																																																																				
anti-S262															○																																																																																																																																																																																																																																																			

(57) 要約

ペアード・ヘリカル・フィラメント (Paired Helical Filament) 中のリン酸化
 タウ蛋白質のリン酸化部位を含む部分ペプチドを免疫原として抗体を調製し、得
 られる抗体と、アルツハイマー病の疑いのある個体から得られた試料との反応性
 を調べることにより、アルツハイマー病の検出を行う。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	SD	スーダン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AZ	アゼルバイジャン	FR	フランス	LV	ラトヴィア	SG	シンガポール
BB	バルバドス	GB	イギリス	MC	モナコ	SI	スロベニア
BF	ブルキナファソ	GE	グルジア	MD	モルドバ	SK	スロバキア
BG	ブルガリア	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	SN	セネガル
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MK	マケドニア	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	UA	ウクライナ	TD	チャド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	ML	マリ	TG	トーゴ
CC	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	JP	日本	MR	モーリタニア	TR	トルコ
CH	スイス	KE	ケニア	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コートジボワール	KR	韓国	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NE	ニジェール	US	米国
CN	中国	KZ	カザフスタン	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CO	コロンビア	LA	ラオス	NO	ノルウェー	VN	ベトナム
CZ	チェコ			PZ	ポルトガル	YU	ユーゴスラビア
DE	ドイツ			RO	ルーマニア		

明細書

抗リン酸化タウ蛋白質抗体及びそれを用いるアルツハイマー病の検出方法

技術分野

本発明はアルツハイマー病の検出に用い得る抗体に関し、更に詳細には、ペアー・ヘリカル・フィラメント (Paired Helical Filament) 中のリン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位を含む部分ペプチドに対する抗体、それを含む試薬キット、及び前記抗体又はキットを用いたアルツハイマー病の検出方法に関する。

背景技術

アルツハイマー病は初老期 (45～65才) に発病する進行性の痴呆で、病的な変化として神経細胞の変質および神経細胞数の減少による大脳皮質の萎縮が認められ、また、病理学的には、その脳内に多数の老人斑と神経原線維変化が認められる。65才以上の老年期に発症するいわゆる自然老化による老年痴呆も、病理学的に何ら本質的な差は認められないため、アルツハイマー型老年痴呆と呼ばれている。

この疾患の患者数は、高齢者人口の増加とともに増大し、社会的に重要な疾患となっている。しかし、この疾患の原因については諸説あるものの結果的には未だ不明であり、早期の解明が望まれている。

アルツハイマー病の病理変化のひとつである老人斑の主要成分が、アミロイドβ蛋白質であることが解明されている (Annu. Rev. Neurosci., 12, 463-490(1989))。また、もうひとつの病理変化である神経原線維変化は、神経細胞内にPHF (ペアー・ヘリカル・フィラメント: Paired helical filament) が蓄積してくるものであり、その構成成分のひとつとしてタウ蛋白質が同定されている (J. Biochem., 99, 1807-1810(1986); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 4913-4917(1986))。

タウ蛋白質は、通常SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量48～6

5 kDに数本のバンドを形成する一群の近縁蛋白質であり、微小管の形成を促進することが知られている。

アルツハイマー病脳のPHF中に組み込まれたタウ蛋白質は、通常脳中のタウ蛋白質よりも異常にリン酸化されていることが、PHFに対するポリクローナル抗体（抗ptau; J. Biochem., 99, 1807-1810(1986)）や、タウ蛋白質に対するモノクローナル抗体（tau-1抗体; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 4913-4917(1986)）を用いて証明されている。また、PHF中に組み込まれたリン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位も決定されるなど（特開平6-239893）、アルツハイマー病におけるタウ蛋白質の機構が判明しつつある。

しかし、PHF中のリン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位に着目してアルツハイマー病の検出を行うことについては現在までに知られておらず、また、種々の抗体を使用したアルツハイマー病の検出方法が提案されてはいるが、臨床上有効な新たな検出方法が求められているのが現状であった。

発明の開示

本発明者らは、PHF中のリン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位に着目し、該リン酸化部位を含む部分ペプチドを免疫原とする抗体がアルツハイマー病の検出に有用であることを見出し本発明を完成するに至った。

即ち本発明によれば、ペアード・ヘリカル・フィラメント（Paired Helical Filament）中のリン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位を含む部分ペプチドを免疫原とする抗体が提供される。

この発明の好ましい態様によれば、リン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位が、配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列中の198番目のセリン、199番目のセリン、202番目のセリン、205番目のスレオニン、231番目のスレオニン、235番目のセリン、262番目のセリン、396番目のセリン、403番目のスレオニン、404番目のセリン、409番目のセリン、412番目のセリン、413番目のセリン及び422番目のセリンから選ばれる1以上のアミノ酸残基である上記抗体；

リン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位が、配列表の配列番号 1 で表されるアミノ酸配列中の 199 番目のセリン、202 番目のセリン、205 番目のスレオニン、231 番目のスレオニン、235 番目のセリン、262 番目のセリン、396 番目のセリン、404 番目のセリン、412 番目のセリン、413 番目のセリン及び 422 番目のセリンから選ばれる 1 以上のアミノ酸残基である上記抗体；

リン酸化部位を含む部分ペプチドが、そのリン酸化部位のアミノ酸残基とその前および／または後の複数個のアミノ酸残基を含むペプチドである上記抗体；

リン酸化部位を含む部分ペプチドが配列表の配列番号 2 から 16 のいずれかに記載のアミノ酸配列で表される上記抗体が提供される。

また、本発明の別の態様によれば、少なくとも、上記いずれかの抗体よりなる、アルツハイマー病の検出に用いるための試薬キットが提供される。

さらに、本発明の別の態様によれば、上記いずれかの抗体と、アルツハイマー病の疑いのある個体から得られた試料との反応性を調べることを特徴とするアルツハイマー病の検出方法が提供される。

本発明を以下に詳細に説明する。

本発明においてタウ蛋白質の具体例としては、Goedert et. alのNeuron, 3, 519-526(1989)に記載の 352 アミノ酸残基～441 アミノ酸残基の一次構造を有するタウ蛋白質等が挙げられる。例えば、一次構造が配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列で表されるタウ蛋白質を使用した場合、同配列の 198 番目のセリン、199 番目のセリン、202 番目のセリン、205 番目のスレオニン、231 番目のスレオニン、235 番目のセリン、262 番目のセリン、396 番目のセリン、403 番目のスレオニン、404 番目のセリン、409 番目のセリン、412 番目のセリン、413 番目のセリンおよび 422 番目のセリンから選ばれる 1 以上のアミノ酸残基がリン酸化される (J. Biol. Chem., 270, 823-829(1995)およびNeurosci. Lett., 189, 167-170(1995))。

本発明においては、上記配列の 199 番目のセリン、202 番目のセリン、205 番目のスレオニン、231 番目のスレオニン、235 番目のセリン、262 番目のセリン、396 番目のセリン、404 番目のセリン、412 番目のセリン、413 番目のセリンおよび 422 番目のセリンから選ばれる 1 以上のアミノ酸残

基がリン酸化されたタウ蛋白質の部分ペプチドであって、これらのリン酸化部位を1以上含むペプチドを使用することが好ましい。

本発明で好ましく用いられるタウ蛋白質の部分ペプチドとしては、上記リン酸化部位のアミノ酸残基とその前および／または後の複数個のアミノ酸残基を含むペプチドが好ましい。特に、リン酸化部位のアミノ酸残基の前または後ろの一方又は両方に、1～7アミノ酸残基、より好ましくは3～5アミノ酸残基含むペプチドが好ましい。更に、これら部分ペプチドの中では、配列表の配列番号2から16のいずれかに記載のアミノ酸配列で表されるものが最も好ましい。

本発明の抗体は、上記のようなリン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位を含む部分ペプチドを免疫原として動物を免疫し、その動物から血清を調製することによって得られる。その際、上記ペプチドのアミノ末端若しくはカルボキシル末端に反応性の官能基を有するアミノ酸、例えばシステイン、リジン、グルタミン酸、アスパラギン酸等を導入したものをハプテンとして担体蛋白質に結合し、それを免疫原に用いることが好ましい。

上記のペプチド中、配列番号3、13、15及び16で表される部分ペプチドは、Tetrahedron Lett., 32, 7083-7086 (1991)に記載されているように、リン酸化部位に対する保護基としてフェニル基を使用した固相法によるペプチド合成法により合成される。

上記以外の配列番号で表されるリン酸化ペプチドのように、芳香族アミノ酸、含硫アミノ酸及び複素環式アミノ酸を有する場合には、Peptide Chemistry 1993, 109-112(1994)に記載されているように、リン酸化部位に対する保護基としてシクロヘキシル基を使用したペプチド固相法、あるいはChem. Lett., 1099-1112 (1994)に記載されているように、リン酸化部位に対する保護基としてベンジル基を使用したペプチド固相法により合成される。

抗体の調製に際して、上記のようにして合成された部分ペプチドを、牛血清アルブミン(BSA)、甲状腺グロブリン、キーホール・リンペットのヘモシアニン等の担体蛋白質に結合させる。結合は、適当な縮合剤、例えばマレイミド、グルタルアルデヒド、カルボジイミド等を用いて容易に行うことができる。かくして得られる担体蛋白質に結合されたペプチドを動物に免疫する。動物の免疫は、

通常の抗体の製造と同様にして行えばよい。すなわち、担体蛋白質に結合されたペプチドを含む溶液を、必要に応じてアジュバントと混合し、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジ等、通常抗体の製造に用いられる動物の皮下または腹腔内に投与する。初回免疫後、2～3週間毎に追加免疫を行うと、力価の高い抗血清が得られる。免疫した動物から血液を採取し、血清を調製する。本発明においては、得られた抗血清は、精製することなくそのまま用いることもできるが、血清を熱処理して補体を失活させた後、硫酸アンモニウムによる塩析、イオン交換クロマトグラフィー等によってイムノグロブリン画分を精製してもよい。また、特定の部分ペプチドを固定化したペプチドカラムを用いて抗体を精製することにより、上記で示したリン酸化部位又はその近傍を特異的に認識する抗体が得られる。

また、免疫した動物から抗体産生細胞を採取し、常法によって、同系動物由来のミエローマ細胞等の培養細胞と融合させてハイブリドーマを作製し、そのハイブリドーマの培養液からイムノグロブリン画分を調製することによって、特定のエピトープを認識するモノクローナル抗体が得られる。

本発明によって得られた抗体とアルツハイマー病の疑いのある個体から得られた試料とを、それ自体既知の通常用いられる方法により免疫反応させ、抗原－抗体反応物を検出して試料と抗体との反応性を調べることによりアルツハイマー病を検出できる。また、得られた抗体を用いて、上記免疫反応及び検出工程等を含むアルツハイマー病の検出に用いるための試薬キットを調製できる。このようなキットは、通常の免疫反応を利用したキットと同様の構成によって提供される。すなわち、本発明の試薬キットは、少なくとも本発明の抗体を含み、さらに任意の要素として、試料希釈液、洗浄液、標識化抗体または標識化抗原、色素、陽性コントロール用のペプチド等を含む。

本発明の抗体又は試薬キットを用いると、例えば次の通りアルツハイマー病を検出できる。

まず、アルツハイマー病の疑いのある個体から試料を入手し、次いで上記のようにして得られた抗体と反応させる。前記試料としては、大脳皮質等の組織、脳脊髄液または血液等の体液が挙げられる。組織の試料を本願発明に従って検出す

る場合、組織が約 0.1 mg 程度必要である。また脳脊髄液や血液を試料として用いる場合、約 0.5 ~ 0.01 ml 程度が必要である。

上記のような試料が得られたあと、その試料を生理的緩衝液中でホモジナイズし、遠心分離し、次いで得られた上清はまず分画して潜在している免疫グロブリンを除去したのち、上記で得られた抗体に対する反応性を指標として試験を行う。

上記で得られた画分を電気泳動にかけ上記で得られた抗体を加えて免疫ブロットを行う。このとき抗体には通常使用されるような標識を付けることにより検出してもよく、この抗体と免疫反応性のある二次抗体と反応させることにより検出してもよい。

このようにして、アルツハイマー病の疑いのある個体について、試料と抗体との反応性を調べ、アルツハイマー病でない個体のコントロールと比較して反応性が増大している場合は、その個体はアルツハイマー病であると確認される。また、アルツハイマー病である個体のコントロールと比較して反応性が低下している場合は、その個体はアルツハイマー病でないと、確認される。このようにして、本発明によってアルツハイマー病の検出を行うことができる。

本発明においては、リン酸化タウ蛋白質全体、あるいは PHF を免疫原として得られる抗体と異なり、各リン酸化部位に対する特異性の高い抗体が得られ、抗原認識の特異性を解析することなく、リン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位特異的検出に有用である。更に、各リン酸化部位について、部位特異的な種々の抗体を効率的に得ることができる。かくして得られる種々の抗体とアルツハイマー病個体の試料との反応性を検討することにより、アルツハイマー病の検出に最も適した抗体を簡便に選択することができる。

図面の簡単な説明

図 1 は、リン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位を含む部分ペプチドを免疫して得られた抗体の特異性を示すドットプロットの図である。

図 2 は、実施例で得られた TS 画分（ヒト大脳皮質懸濁液の上清から IgG を除去した画分）と本発明で用いる抗体との反応性を示す電気泳動の写真（免疫ブ

ロット)である。

図3は、実施例で得られたSDS沈殿画分と本発明で用いる抗体との反応性を示す電気泳動の写真(免疫プロット)である。

図4は、実施例で得られたSDS沈殿画分と本発明で用いる抗体との反応性を示す電気泳動の写真(免疫プロット)である。

図5は、実施例で得られた競合法RIA測定系における検量線である。

図6は、実施例で得られたアルツハイマー病患者および非痴呆患者の脳脊髄液中のリン酸化タウ蛋白質濃度の測定結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

製造例1 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列を有する部分ペプチド(以下、本ペプチドを「PS202」、本ペプチドに対する抗体を「anti-PS202」と称することもある)の調製

H-Lys-Ser-Ser-Pro-Gly-Ser(H₂PO₃)-Pro-Gly-Thr-Pro-Gly-Ser-Arg-NH₂(配列番号3)で表されるペプチドを次に述べる方法により製造した。なお、以下の説明で用いる記号は各々次のものを示す。MBHA樹脂:p-メチルベンツヒドリルアミン樹脂;Boc:t-ブチルオキシカルボニル基;Bzl:ベンジル基;Ph:フェニル基;Tos:p-トルエンスルホニル基;Z(2-Cl):2-クロルベンジルオキシカルボニル基。

(イ) H-Lys[Z(2-Cl)]-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Pro-Gly-Ser[PO(OPh)₂]-Pro-Gly-Thr(Bzl)-Pro-Gly-Ser(Bzl)-Arg(Tos)-MBHA樹脂の製造

MBHA樹脂0.94g(アミン含量0.64mmol/g樹脂)をバイオサーチ社製9500型自動ペプチド合成機にセットし、これにBoc-Arg(Tos)-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Pro

-OH, Boc-Ser[PO(OPh)₂]-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Lys[Z(2-Cl)]-OHを供給して、ジイソプロピルカルボジイミドを縮合剤として順次縮合させて上記の側鎖保護ペプチド-MBHA樹脂 2.38 gを得た。

(ロ) フッ化水素処理

上記(イ)で得た側鎖保護ペプチド-MBHA樹脂中の1.34 gを採取し、これを蛋白質研究奨励会ペプチド研究所製のフッ化水素反応装置にセットし、1.5 mlのアニソールの存在下で13 mlのフッ化水素と氷冷下1時間反応させた。反応終了後、フッ化水素を減圧下留去し、残留物を酢酸エチルで洗浄した後、2 M酢酸150 mlで抽出処理してH-Lys-Ser-Ser-Pro-Gly-Ser[PO(OPh)₂]-Pro-Gly-Thr-Pro-Gly-Ser-Arg-NH₂で表されるリン酸基を保護した粗ペプチド350 mgを得た。

これを30%酢酸20 mlに溶解してセファデックスG-25のカラム(内径5 cm、長さ109 cm)にかけ、同じ溶媒を用いて溶出して目的物を含む画分を集めた。次いでこれを少量の蒸留水に溶解しODS(オクタデシルシラン)をシリカに結合した逆相系のカラム(内径2 cm、長さ25 cm)を用いたHPLC(高速液体クロマトグラフィー)により精製した。溶出は0.1%トリフルオロ酢酸中、5から65%のアセトニトリルの直線濃度勾配により行った。精製物の収量は110 mgであった。本物質の構造はFAB質量分析により確認された。測定値[M+H]⁺; 1445、計算値(C₆₁H₉₂N₁₈O₂₁P₁+H); 1445。

(ハ) 加水素分解

上記(ロ)で得たリン酸基を保護したペプチド90 mg及び酸化白金80 mg(触媒)を1 mlの酢酸と混合して5~6気圧の水素圧下、室温で12時間攪拌した後、触媒を濾過した。濾液及び洗液を集めて凍結乾燥し、分取HPLCにより精製して最終目的物であるH-Lys-Ser-Ser-Pro-Gly-Ser(H₂PO₃)-Pro-Gly-Thr-Pro-Gly-Ser-Arg-NH₂で表されるリン酸化ペプチド55 mgを得た。本物質の構造はFAB質量分析により確認された。測定値[M+H]⁺; 1294、計算値(C₄₉H₈₅N₁₈O₂₁P₁+H); 1294。

製造例 2 ～ 4

配列表の配列番号 13、15 及び 16 に記載のアミノ酸配列を有する部分ペプチドについても上記製造例 1 と同様にして得た(以下、これらのペプチドをそれぞれ「PS413」、「PS412」、「PS412,413」、これらのペプチドに対する抗体をそれぞれ「anti-PS413」、「anti-PS412」、「anti-PS412,413」と称することもある)。

製造例 5 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する部分ペプチド(以下、本ペプチドを「PS199」、本ペプチドに対する抗体を「anti-PS199」と称することもある)の調製

H-Lys-Ser-Gly-Tyr-Ser-Ser(H_2PO_3)-Pro-Gly-Ser-Pro-Gly-Thr- NH_2 (配列番号 2) で表されるペプチドを次に述べる方法により製造した。なお、以下の説明で用いる記号は各々次のものを示す。MBHA樹脂：p-メチルベンツヒドリルアミン樹脂；Boc：t-ブチルオキシカルボニル基；Bzl：ベンジル基；cHex：シクロヘキシル基；Z(2-Br)：2-ブロモベンジルオキシカルボニル基；Z(2-Cl)：2-クロルベンジルオキシカルボニル基。

(イ) H-Lys[Z(2-Cl)]-Ser(Bzl)-Gly-Tyr[Z(2-Br)]-Ser(Bzl)-Ser[PO(OcHex) $_2$]-Pro-Gly-Ser(Bzl)-Pro-Gly-Thr(Bzl)-MBHA樹脂の製造

MBHA樹脂 131 mg (アミン含量 0.76 mmol / g 樹脂) をバイオサーチ社製 9500 型自動ペプチド合成機にセットし、これに Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Ser[PO(OcHex) $_2$]-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Tyr[Z(2-Br)]-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Lys[Z(2-Cl)]-OH を供給し、ジイソプロピルカルボジイミドを縮合剤として順次縮合させて上記の側鎖保護ペプチド-MBHA樹脂 307 mg を得た。

(ロ) トリフルオロメタンスルホン酸処理

上記 (イ) で得た側鎖保護ペプチド-MBHA樹脂中の 150 mg を採取し、これに

1 M濃度のメタンスルホン酸とチオアニソールを含むトリフルオロ酢酸 10 ml とm-クレゾール 0.05 ml を加え、氷冷下4時間反応させた。反応終了後、氷冷したジエチルエーテル 200 ml を加えてペプチドを沈殿させた。全内容物をガラスフィルターで濾取し、冷ジエチルエーテルで洗浄した後2 M酢酸 200 ml で抽出処理してH-Lys-Ser-Gly-Tyr-Ser-Ser(H₂PO₃)-Pro-Gly-Ser-Pro-Gly-Thr-NH₂ で表される粗ペプチド 53 mg を得た。

(ハ) ペプチドの精製

これを蒸留水 6 ml に溶解しODS (オクタデシルシラン) をシリカに結合した逆相系のカラム (内径 2 cm、長さ 25 cm) を用いたHPLCにより精製した。溶出は0.1%トリフルオロ酢酸中、5から35%のアセトニトリルの直線濃度勾配により行った。精製物の収量は29 mgであった。本物質の構造はFAB質量分析により確認された。測定値 [M+H]⁺; 1204、計算値 (C₄₇H₇₅N₁₄O₂₁P₁+H) ; 1204。

製造例 6 配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有する部分ペプチド(以下、本ペプチドを「PT231」、本ペプチドに対する抗体を「anti-PT231」と称することもある)の調製

H-Cys-Val-Ala-Val-Val-Arg-Thr(H₂PO₃)-Pro-Pro-Lys-Ser-Pro-Ser-Ser-OH (配列番号 6) で表されるペプチドを次に述べる方法により製造した。なお、以下の説明で用いる記号は各々次のものを示す。Bzl樹脂: ベンジルアルコール樹脂; Boc: t-ブチルオキシカルボニル基; Bzl: ベンジル基; MBzl: 4-メトキシベンジル基; Mts: メチレンスルホニル基; cHex: シクロヘキシル基; Z(2-Cl): 2-クロルベンジルオキシカルボニル基。

(イ) H-Cys(MBzl)-Val-Ala-Val-Val-Arg(Mts)-Thr[PO(OcHex)₂]-Pro-Pro-Lys[Z(2-Cl)]-Ser(Bzl)-Pro-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Bzl樹脂の製造

Boc-Ser(Bzl)-Bzl樹脂 71 mg (アミン含量 0.70 mmol / g 樹脂) をバイオサーチ社製 9500 型自動ペプチド合成機にセットし、これにBoc-Ser(Bzl)

-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Lys[Z(2-Cl)]-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Thr[PO(OcHex)₂]-OH, Boc-Arg(Mts)-OH, Boc-Val-OH, Boc-Val-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Val-OH, Boc-Cys(MBzl)-OHを供給し、ジイソプロピルカルボジイミドを縮合剤として順次縮合させて上記の側鎖保護ペプチド-Bzl樹脂 62 mgを得た。

(ロ) トリフルオロメタンスルホン酸処理

上記(イ)で得た側鎖保護ペプチド-Bzl樹脂 62 mgにトリフルオロメタンスルホン酸 0.9 mlとチオアニソール 1.2 mlとトリフルオロ酢酸 6.6 mlとm-クレゾール 0.9 mlとエタンジチオール 0.4 mlを加え、氷冷下5分、続いて室温で3時間反応させた。反応終了後、氷冷したジエチルエーテル 200 mlを加えてペプチドを沈殿させた。全内容物をガラスフィルターで濾取し、冷ジエチルエーテルで洗浄した後2 M酢酸 170 mlで抽出処理してH-Cys-Val-Ala-Val-Val-Arg-Thr(H₂PO₃)-Pro-Pro-Lys-Ser-Pro-Ser-Ser-OHで表される粗ペプチド 21 mgを得た。

(ハ) ペプチドの精製

これを30%酢酸 10 mlに溶解してセファデックス G-25のカラム(内径 5 cm、長さ 107 cm)にかけ、同じ溶媒を用いて溶出して目的物を含む画分を集めた。この精製物の収量は12 mgであった。

これを30%酢酸 5 mlに溶解しODS(オクタデシルシラン)をシリカに結合した逆相系のカラム(内径 2 cm、長さ 25 cm)を用いたHPLCにより精製した。溶出は0.1%トリフルオロ酢酸中、13%のアセトニトリルにより行った。精製物の収量は7 mgであった。本物質の構造はFAB質量分析により確認された。測定値[M+H]⁺; 1509、計算値(C₆₁H₁₀₇N₁₈O₂₂P₁S₁+H); 1508。

製造例 7 配列表の配列番号 11に記載のアミノ酸配列を有する部分ペプチド(以下、本ペプチドを「PS396」、本ペプチドに対する抗体を「anti-PS396」と称することもある)の調製

H-Cys-Glu-Ile-Val-Tyr-Lys-Ser(H_2PO_3)-Pro-Val-Val-Ser-Gly-NH₂ (配列番号 11) で表されるペプチドを次に述べる方法により製造した。なお、以下の説明で用いる記号は各々次のものを示す。MBHA樹脂: p-メチルベンツヒドリルアミン樹脂; Boc: t-ブチルオキシカルボニル基; Bzl: ベンジル基; MBzl: 4-メトキシベンジル基; cHex: シクロヘキシル基; Z(2-Br): 2-ブロモベンジルオキシカルボニル基; Z(2-Cl): 2-クロルベンジルオキシカルボニル基。

(イ) H-Cys(MBzl)-Glu(OBzl)-Ile-Val-Tyr[Z(2-Br)]-Lys[Z(2-Cl)]-Ser[PO(OcHex)₂]-Pro-Val-Val-Ser(Bzl)-Gly-MBHA樹脂の製造

MBHA樹脂 131 mg (アミン含量 0.76 mmol/g 樹脂) をバイオサーチ社製 9500 型自動ペプチド合成機にセットし、これに Boc-Gly-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Val-OH, Boc-Val-OH, Boc-Pro-OH, Ser[PO(OcHex)₂]-OH, Boc-Lys[Z(2-Cl)]-OH, Tyr[Z(2-Br)]-OH, Boc-Val-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Glu(OBzl)-OH, Boc-Cys(MBzl)-OH を供給し、ジイソプロピルカルボジイミドを縮合剤として順次縮合させて上記の側鎖保護ペプチド-MBHA樹脂 376 mg を得た。

(ロ) トリフルオロメタンスルホン酸処理

上記(イ)で得た側鎖保護ペプチド-MBHA樹脂中の 188 mg を採取し、これに 1 M 濃度のメタンスルホン酸とチオアニソールを含むトリフルオロ酢酸 10 ml と m-クレゾール 0.05 ml を加え、氷冷下 4 時間反応させた。反応終了後、氷冷したジエチルエーテル 200 ml を加えてペプチドを沈殿させた。全内容物をグラスフィルターで濾取し、冷ジエチルエーテルで洗浄した後 2 M 酢酸 200 ml で抽出処理して H-Cys-Glu-Ile-Val-Tyr-Lys-Ser(H_2PO_3)-Pro-Val-Val-Ser-Gly-NH₂ で表される粗ペプチド 87 mg を得た。

(ハ) ペプチドの精製

これを 30% 酢酸 9 ml に溶解し ODS (オクタデシルシラン) をシリカに結合した逆相系のカラム (内径 2 cm、長さ 25 cm) を用いた HPLC により精製した。溶出は 0.1% トリフルオロ酢酸中、16% のアセトニトリルにより行った。精製物の収量は 45 mg であった。本物質の構造は FAB 質量分析により

確認された。測定値 $[M+H]^+$; 1360、計算値 ($C_{57}H_{95}N_{14}O_{20}P_1S_1+H$); 1360。

製造例 8 ~ 10

配列表の配列番号 4、12 及び 14 に記載のアミノ酸配列を有する部分ペプチドについても上記製造例 5、6 および 7 と同様にして得た(以下、これらのペプチドをそれぞれ「PT205」、「PS404」、「PS422」、これらのペプチドに対する抗体をそれぞれ「anti-PT205」、「anti-PS404」、「anti-PS422」と称することもある)。

製造例 11 配列表の配列番号 7 に記載のアミノ酸配列を有する部分ペプチド(以下、本ペプチドを「PS235」、本ペプチドに対する抗体を「anti-PS235」と称することもある)の調製

H-Cys-Arg-Thr-Pro-Pro-Lys-Ser(H_2PO_3)-Pro-Ser-Ser-Ala-Lys-OH (配列番号 7) で表されるペプチドを次に述べる方法により製造した。なお、以下の説明で用いる記号は各々次のものを示す。Alko樹脂: p-アルコキシベンジルアルコール樹脂; Boc: t-ブチルオキシカルボニル基; tBu: t-ブチル基; Bzl: ベンジル基; Fmoc: 9-フルオレニルメトキシカルボニル基; Trt: トリチル基; Pmc: ペンタメチルクロマン-6-スルホニル基。

(イ) H-Cys(Trt)-Arg(Pmc)-Thr(tBu)-Pro-Pro-Lys(Boc)-Ser[PO(OH)(OBzl)]-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ala-Lys(Boc)-Alko樹脂の製造

Fmoc-Lys(Boc)-Alko樹脂 385 mg (アミノ酸含量 0.65 mmol / g 樹脂) をアプライドバイオシステムズ社製 431A 型自動ペプチド合成機にセットし、これに Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser[PO(OH)(OBzl)]-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH を供給し、HBTU [2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate] を縮合剤として順次縮合させ

て側鎖保護ペプチド-Alko樹脂中間体 716 mg を得た。この中間体 358 mg に Fmoc-Cys(Trt)-OH を縮合し上記の側鎖保護ペプチド-Alko樹脂 395 mg を得た。

(ロ) トリフルオロ酢酸処理

上記 (イ) で得た側鎖保護ペプチド-Alko樹脂中の 196 mg を採取し、これに トリフルオロ酢酸 8.25 ml、精製水 0.5 ml、チオアニソール 0.5 ml、フェノール 0.75 ml、エタンジチオール 0.25 ml よりなる混合液を加え、室温で 1.5 時間反応させた。反応終了後、氷冷したジエチルエーテル 200 ml を加えてペプチドを沈殿させた。全内容物をガラスフィルターで濾取し、冷ジエチルエーテルで洗浄した後 2 M 酢酸 80 ml で抽出処理して H-Cys-Arg-Thr-Pro-Pro-Lys-Ser(H₂PO₃)-Pro-Ser-Ser-Ala-Lys-OH で表される粗ペプチド 82 mg を得た。

(ハ) ペプチドの精製

これを 0.1% トリフルオロ酢酸 7 ml に溶解し ODS (オクタデシルシラン) をシリカに結合した逆相系のカラム (内径 2 cm、長さ 25 cm) を用いた HPLC により精製した。溶出は 0.1% トリフルオロ酢酸中、7% のアセトニトリルにより行った。精製物の収量は 62 mg であった。本物質の構造は FAB 質量分析により確認された。測定値 $[M+H]^+$; 1339、計算値 (C₅₂H₉₂N₁₇O₂₀P₁S₁+H); 1339。

製造例 12 ~ 15

配列表の配列番号 5、8、9 及び 10 に記載のアミノ酸配列を有する部分ペプチドについても上記製造例 11 と同様にして得た (以下、これらのペプチドをそれぞれ「PS199, 202」、「ratPS235」、「PT231, PS235」、「PS262」、これらのペプチドに対する抗体をそれぞれ「anti-PS199, 202」、「anti-ratPS235」、「anti-PT231, PS235」、「anti-PS262」と称することもある)。

製造例 1 6 配列表の配列番号 1 7 に記載のアミノ酸配列を有する部分ペプチド(以下、本ペプチドを「Tau-C」、本ペプチドに対する抗体を「anti-Tau-C」と称することもある)の調製

H-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Asp-Glu-Val-Ser-Ala-Ser-Leu-Ala-Lys-OH (配列番号 1 7) で表されるアミノ酸配列をもつペプチドを次に述べる方法により製造した。なお、以下の説明で用いる記号は各々次のものを示す。Alko樹脂 : p-アルコキシベンジルアルコール樹脂 ; Boc : t-ブチルオキシカルボニル基 ; t Bu : t-ブチル基 ; Bzl : ベンジル基 ; Fmoc : 9-フルオレニルメトキシカルボニル基 ; Trt : トリチル基。

(イ) H-Ser(tBu)-Pro-Gln(Trt)-Leu-Ala-Thr(tBu)-Leu-Ala-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Val-Ser(tBu)-Ala-Ser-Leu-Ala-Lys(Boc)-Alko樹脂の製造

Alko樹脂 2 8 4 m g (アミン含量 0 . 8 8 m m o l / g 樹脂) をABI社製 A 4 3 1 型自動ペプチド合成機にセットし、これにFmoc-Lys(Boc)-OHをジメチルアミノピリジンとジイソプロピルカルボジイミドを縮合剤として結合し、これにFmoc-Ala-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OHを供給し、HBTU [2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate]を縮合剤として順次縮合させて上記の側鎖保護ペプチド-Alko樹脂 9 0 5 m g を得た。

(ロ) トリフルオロ酢酸処理

上記(イ)で得た側鎖保護ペプチド-Alko樹脂中の 5 4 3 m g を採取し、これにトリフルオロ酢酸 9 . 5 m l とエタンジチオール 0 . 2 5 m l と蒸留水 0 . 5 m l を加え、氷冷下 5 分、続いて室温で 1 . 5 時間反応させた。反応終了後、氷冷したジエチルエーテル 2 0 0 m l を加えてペプチドを沈殿させた。全内容物をガラスフィルターで濾取し、冷ジエチルエーテルで洗浄した後 2 M 酢酸 1 0 0 m l で抽出してH-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Asp-Glu-Val-Ser-Ala-Ser-Leu-

Ala-Lys-OHで表される粗ペプチド250mgを得た。

(ハ) ペプチドの精製

これを30%酢酸20mlに溶解してセファデックスG-25のカラム(内径5cm、長さ107cm)にかけ、同じ溶媒を用いて溶出して目的物を含む画分を集めた。この精製物の収量は122mgであった。本物質の構造はFAB質量分析により確認された。測定値 $[M+H]^+$; 1702、計算値 $(C_{73}H_{125}N_{19}O_{27}S_2+H)$; 1701。

製造例17 配列表の配列番号18に記載のアミノ酸配列を有する部分ペプチド(以下、本ペプチドを「Tau-N」、本ペプチドに対する抗体を「anti-Tau-N」と称することもある)の調製

H-Ala-Glu-Pro-Arg-Gln-Glu-Glu-Phe-Glu-Val-Met-Glu-Cys-NH₂ (配列番号18)で表されるアミノ酸配列をもつペプチドを次に述べる方法により製造した。なお、以下の説明で用いる記号は各々次のものを示す。Fmoc-NH-SAL樹脂: 4-(2',4'-dimethoxyphenyl)-Fmoc-aminoethyl)-phenoxy樹脂; Boc: t-ブチルオキシカルボニル基; tBu: t-ブチル基; Bzl: ベンジル基; Fmoc: 9-フルオレニルメトキシカルボニル基; Trt: トリチル基; Pmc: ペンタメチルクロマン-6-スルホニル基。

(イ) H-Ala-Glu(OtBu)-Pro-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Glu(OtBu)-Phe-Glu(OtBu)-Val-Met-Glu(OtBu)-Cys(Trt)-NH-SAL樹脂の製造

Fmoc-NH-SAL樹脂532mg (アミン含量0.47mmol/g 樹脂)をABI社製A431型自動ペプチド合成機にセットし、これにFmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ala-OHを供給し、HBTU [2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate]を縮合剤として順次縮合させて上記の側鎖保護ペプチド-NH-SAL樹脂1122mgを得た。

(ロ) トリフルオロ酢酸処理

上記(イ)で得た側鎖保護ペプチド-NH-SAL樹脂中の673mgを採取し、これにフェノール0.75mlとチオアニソール0.5mlとトリフルオロ酢酸8.25mlとエタンジチオール0.25mlと蒸留水0.5mlを加え、氷冷下5分、続いて室温で1.5時間反応させた。反応終了後、氷冷したジエチルエーテル200mlを加えてペプチドを沈殿させた。全内容物をグラスフィルターで濾取し、冷ジエチルエーテルで洗浄した後2M酢酸50mlと蒸留水250mlで抽出処理してH-Ala-Glu-Pro-Arg-Gln-Glu-Glu-Phe-Glu-Val-Met-Glu-Cys-NH₂で表される粗ペプチド182mgを得た。

(ハ) ペプチドの精製

これを30%酢酸20mlに溶解してセファデックスG-25のカラム(内径5cm、長さ107cm)にかけ、同じ溶媒を用いて溶出して目的物を含む画分を集めた。この精製物の収量は136mgであった。

これを20%アセトニトリル20mlに溶解しODS(オクタデシルシラン)をシリカに結合した逆相系のカラム(内径2cm、長さ25cm)を用いたHPLCにより精製した。溶出は0.1%トリフルオロ酢酸中、22%のアセトニトリルにより行った。精製物の収量は96mgであった。本物質の構造はFAB質量分析により確認された。測定値[M+H]⁺; 1467、計算値(C₆₁H₉₅N₁₇O₂₁S₂+H); 1467。

実施例 1 抗体の調製

上記製造例1～17で得られた部分ペプチドを、等重量のキーホール・リンペットのヘモシアニンに結合させて免疫原を調製した。免疫原0.2mgを0.3mlの生理食塩水に溶解し、等容量のフロイントアジュバントと乳濁させて、3週間毎にウサギに免疫した。得られた抗血清をImmunopure gentle Ag/Ab buffer system(Pierce社製)を使用し、それぞれの抗原ペプチドを結合させたAffigel 15(Bio-Rad社製)カラムから溶出させることにより精製して、上記で示したリン酸化部位を特異的に認識する抗体が得られた。

抗体の特異性は、ドットブロットで確認した。

即ち、immobilon P-membrane (Millipore社製) に70% DMSO溶液の各種ペプチドを18 pmol ずつ点(ドット)になるように並べて吸着させ乾燥させた。このmembraneを5% スキムミルク入りのTBS (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl) に1時間浸して、以後の操作で加える抗体が非特異的にmembraneに結合することを防いだ。その後TBSで5分間3回洗い、目的の抗体(一次抗体)を加えたTBSに浸しパラフィルムに挟み湿箱中で4℃14時間反応させ、membrane上の抗原ペプチドに一次抗体を結合させた。0.05%

Tween 20入りのTBS (TBS-T) でmembraneを5分間3回洗った。以下、発色までの操作はProtoBlot Western Blot AP System (Promega社製) を用いた。

アルカリホスファターゼの共有結合した抗ウサギIgG抗体(二次抗体)をTBS-Tで5000倍希釈し、その希釈液にmembraneを4℃で2時間浸すことでmembrane上の抗原-一次抗体結合物に二次抗体を介してアルカリホスファターゼを結合させた。TBS-Tでmembraneを5分間3回、TBSで5分間2回洗い、その後membrane上のアルカリホスファターゼの存在を、発色剤 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) とnitro blue tetrazolium (NBT) をそれぞれ0.165 mg/ml と0.33 mg/ml の濃度で含む反応液(100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) にmembraneを浸し紫色に発色させることで検出した。membraneを水に浸すことで反応を停止させた。

この実施例で用いた一次抗体はすべてウサギの抗血清のままであるが、抗血清からペプチドカラムによってアフィニティ精製したIgGでも同様な結果が得られることを確認した。抗血清の希釈率は、anti-PS199が1000倍、anti-PS202が250倍、anti-PT205が500倍、anti-PT231が250倍、anti-PS235が25倍、anti-rat PS235(anti-rPS235)が25倍、anti-PS262が500倍、anti-PS396が1000倍、anti-PS404が500倍、anti-PS413が500倍、anti-PS422が500倍である。なお、コントロールとして配列番号19のアミノ酸配列で表されるペプチド(図1中、K1で示す、配列番号1の226番目から240番目のアミ

ノ酸配列で表されるペプチド)、配列番号20のアミノ酸配列で表されるペプチド(図1中、K2で示す、配列番号1の191番目から224番目のアミノ酸配列で表されるペプチド)、配列番号21のアミノ酸配列で表されるペプチド(図1中、AK-K3で示す、配列番号1の384番目から438番目のアミノ酸配列で表されるペプチド)および配列番号22のアミノ酸配列で表されるペプチド(図1中、S262で示す、配列番号1の257番目から267番目のアミノ酸配列で表されるペプチドのN末端にシステインを付加させたもの)の非リン酸化ペプチドを使用した。これらのペプチドは、上記製造例1の(イ)~(ロ)と同様にして製造した。

図1にドットプロットの結果を示す。横軸にドットでメンブレンに吸着させたペプチド、縦軸に抗体を示す。上記で得られた抗体がそれぞれのリン酸化部位に対して特異的に結合していることがわかる。

実施例2 抗体と試料との反応性の検討

(1) ヒト脳抽出液の調製

正常ヒト脳8例とアルツハイマー病患者脳19例を用いてヒト脳抽出液の調製を行った。また、以下の操作はすべて4℃で行った。

死後のヒト大脳皮質の凍結標品から1gを取り出し、T S i n h 溶液[50 mM Tris-HCl (pH 7.6)、0.15 M NaCl、0.5 mM D I F P (ジイソプロピルフルオロフォスフェート)、1 μg/ml アンチパイン、0.5 mM P M S F、(フェニルメタンサルフォニルフルオリド) 1 mg/ml T L C K (トリシルーリシンークロロメチルケトン)、1 μg/ml ロイペプチン、0.1 μg/ml ペプスタチン] 3 ml 中で剃刀で細かく刻み、超音波破碎し、さらにホモジナイザーにより懸濁液にした。80,000 rpm で15分の遠心分離を行い、上清を得た。この上清中のヒト I g G を Protein G-Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia社製)により除去して得た画分を T S 画分とした。沈殿を前述の T S i n h 2 ml 中で超音波破碎とホモジナイザーにより懸濁液にし80,000 rpm、15分の遠心分離を行うことで洗浄し、その後この沈殿を1% T

riton X-100、TSinh 2ml 中で超音波破碎とホモジナイザーにより懸濁液にした。この懸濁液に対し、80,000rpm、15分の遠心分離を行い、上清(TX画分)を得た。沈殿を1%Triton X-100、TSinh 2ml 中で超音波破碎とホモジナイザーにより懸濁液にし、80,000rpm、15分の遠心分離を行うことで洗浄し、その後2%SDS、TSinh 2ml 中で超音波破碎とホモジナイザーにより懸濁液にした。80,000rpm、15分の遠心分離を行い上清(SDS上清画分)を得た。沈殿を2%SDS、TSinh 2ml 中で超音波破碎とホモジナイザーにより懸濁液にし、80,000rpm、15分の遠心分離を行うことで洗浄し、その後この沈殿を2%SDS、TSinh 2ml 中で超音波破碎とホモジナイザーにより懸濁液(SDS沈殿画分)にした。

(2) リン酸化部位特異抗体による免疫ブロット

上記で得られた各画分にLaemmliのサンプル処理液(Nature, 227, 680-685(1970))を加え、95℃で5分間加熱し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動し、Immobilon P-membrane(Millipore社製)に転写した。5%スキムミルク、TBSで2時間ブロッキングした後、上記実施例1で得られたリン酸化部位特異抗体を一次抗体として14時間反応させた。Tween20、TBSで洗った後、Promega社のProtoBlot APにより二次抗体処理してメンブレン上の抗原抗体反応物を発色させた。

一次抗体はすべてウサギのIgGで、一次抗体の希釈率は実施例の図2～図4中の各抗体の名称の下にxの次の数字で示した。ほとんどの一次抗体は抗原ペプチドカラムによってアフィニティ精製してあるが、PS262とPS422は抗血清のままであり、図中のこれらの抗体名称の下にSを付して区別した。

Tau-NおよびTau-Cはそれぞれ製造例16および製造例17で得られたペプチドで、配列表の配列番号1で表されるヒトタウ蛋白質中、Tau-Nは2番目から12番目のアミノ酸配列に対応し、Tau-Cは422番目から438番目のアミノ酸配列に対応し、それぞれタウ蛋白質の存在を示すコントロールとして使用した。

なお、ポジティブコントロールとして生後8日目の幼若ラット全脳抽出液を使

用した。幼若タウ蛋白質は高度にリン酸化されたP H F中のタウ蛋白質として知られている(J. Biol. Chem., 268, 25712-25717(1993))。生後8日目の幼若ラット脳0.75gを、10mM Tris-HCl (pH 7.4)、50mM NaCl、50mM NaF、1mM EDTA、1mM EGTA、50mM β -グリセロリン酸、 10^{-4} M Na_3VO_4 、1mM PMSF、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ アンチパイン、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ロイペプチン、 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ ペプスタチン、3mMベンズアミジンを含む培地1.5ml中でホモジナイズし、25,000rpmで20分遠心分離を行った後の上清をポジティブコントロールとして使用した。

結果を図2、図3及び図4に示す。図2はTS画分の免疫プロット結果を示し、図3及び図4はSDS沈殿画分の免疫プロット結果を示す。図中、AD/Nの欄のAはアルツハイマー病患者脳抽出液の結果を、Nは正常脳抽出液の結果を示し、Mのレーンは分子量マーカーを、その隣の数字はマーカーの分子量をkDの単位で示す。rat P8のレーンはポジティブコントロールの免疫プロット結果を示し、矢印で示したバンドがリン酸化タウ蛋白質のバンドを示す。

いずれの抗体も正常脳抽出液では反応せず、アルツハイマー病患者脳抽出液では反応しており、本発明の方法によりアルツハイマー病の検出が可能であることがわかる。また、TS画分は易溶性のタウ蛋白質を、SDS沈殿画分は難溶性のタウ蛋白質を含むため、本発明の方法によれば、組織中のリン酸化タウ蛋白質の存在だけでなく、易溶性タウ蛋白質を含むと思われる脳脊髄液または血中のリン酸化タウ蛋白質の存在も認識可能であり、試料として組織だけでなく脳脊髄液または血液も使用可能であることがわかる。

実施例3 抗ヒトリン酸化タウ蛋白抗体と試料とのラジオイムノアッセイ(RIA)による反応性の検討

(1) ^{125}I 標識抗原の調製

(イ) Bolton-Hunter法による標識

製造例1～5(配列表の配列番号3、13、15、16および2)に示したようにアミノ末端にリジンを付加したペプチドについては、次に述べる方法により

^{125}I 標識体を製造した。

^{125}I - Bolton-Hunter 試薬のベンゼン溶液 18.5 MBq ($500\text{ }\mu\text{Ci}$; Du Pont 社、NEX-120) を反応用試験管に取り、ベンゼンを窒素气流で揮散させた。これにペプチド $20\text{ }\mu\text{g}$ を $50\text{ }\mu\text{l}$ の 500 mM 塩化ナトリウム 160 mM ホウ酸緩衝液 ($\text{pH } 8.5$) に溶解して加え、冷却下にときどきかき混ぜながら 2 時間反応させた。 10% ヨウ化カリウム水溶液 $10\text{ }\mu\text{l}$ 、 0.1% トリフルオロ酢酸 $700\text{ }\mu\text{l}$ を加え、ODS (オクタデシルシラン) をシリカに結合した逆相系のカラム (内径 4 mm 、長さ 25 cm) を用いた HPLC により精製した。溶出は 0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリルを 1% / 分の濃度勾配で 60% まで上昇させながら実施した。溶出液の流速は 1 ml / 分であり、溶出液を 0.5 分毎に分画した。放射能検出器でモニターしたピークに相当する付近の分画の一部をシンチレーションカウンターで測定して目的とする分画を確認した。この分画に 2% ウシ血清アルブミン (BSA)、 0.05% アジ化ナトリウム、 0.05% Tween 20 を含むリン酸緩衝液 (Dulbecco's PBS (-)、 $\text{pH } 7.3$) を加えて 100 万 ~ 400 万カウント / 分 (cpm) ずつバイアル瓶に小分けし、凍結乾燥した。

(ロ) クロラミン-T 法による標識

製造例 6 ~ 14 (配列表の配列番号 6、11、4、12、14、7、5、8、9) に示したようにアミノ末端にシステインを付加したペプチドについては、製造例 11 に準じた Fmoc 法によってアミノ末端にシステインの代りにチロシンを付加したペプチドを合成し、次に述べる方法により ^{125}I 標識体を製造した。

ペプチド $10\text{ }\mu\text{g}$ を $50\text{ }\mu\text{l}$ の 0.2 M リン酸緩衝液 ($\text{pH } 7.3$) に溶解し、 $\text{Na } ^{125}\text{I}$ 18.5 MBq ($500\text{ }\mu\text{Ci}$; Du Pont 社、NEZ-033H) を加えてかき混ぜた。chloramine T $3\text{ }\mu\text{g}$ (1 mg/ml 0.2 M リン酸緩衝液; 添加直前に溶解する) を加えてかき混ぜ、室温で 5 分間反応させた。アスコルビン酸 $17.5\text{ }\mu\text{g}$ (0.7 mg/ml 0.2 M リン酸緩衝液; 添加直前に溶解する) を加えてかき混ぜ、室温で 1 分間反応させた。 10% ヨウ化カリウム水溶液 $10\text{ }\mu\text{l}$ 、 0.1% トリフルオロ酢酸 $700\text{ }\mu\text{l}$ を加え、

(イ)の場合と同様に逆相系HPLCにより精製、分画し、目的の分画をバイアル瓶に小分けし、凍結乾燥した。

(2) 競合法RIA測定系

製造例18で調製した抗体のうち「anti-PS262」の例を以下に示す。

(1)で得られた ^{125}I -YPS262をRIA緩衝液(0.1%BSA、0.05%アジ化ナトリウム、0.05%Tween20を含むDulbecco's PBS(-))に溶解してアッセイチューブに $100\mu\text{l}$ (約1万cpm)加えた。更に標準品としてアミノ酸定量したペプチドYPS262を $0\sim 10000\text{fmol/ml}$ の範囲で含有するRIA緩衝液 $100\mu\text{l}$ を加えた。続いて、RIA緩衝液 $300\mu\text{l}$ を加えた後、RIA緩衝液にて1万倍に希釈した「anti-PS262」 $100\mu\text{l}$ を加えてかき混ぜた。 4°C で1晩インキュベートした後、RIA bufferで128倍に希釈した正常兎血清 $100\mu\text{l}$ と32倍に希釈した抗兎IgG山羊血清 $100\mu\text{l}$ 、更に8%ポリエチレングリコール(PEG6000)、0.2%セルロース粉末(Avicel(登録商標))を含むDulbecco's PBS(-) $200\mu\text{l}$ を加えてかき混ぜ、 4°C で30分間インキュベートした。 4°C 、 3000rpm 、20分間遠心分離した後、上清を吸引除去して沈渣の放射能をシンチレーションカウンターにて測定した。

横軸に標準物質濃度 fmol/ml 、縦軸に標準物質濃度 0fmol/ml におけるカウントに対する各濃度におけるカウントの比率をとってプロットして検量線を得た。この検量線を図5に示す。図5より、本発明の測定方法を用いれば、 30fmol/ml まで精度よく測定可能であることがわかる。

更に、製造例11に準じたFmoc法によってアミノ末端にシステインを付加せず、セリンがリン酸化されていない配列表の配列番号10の誘導体ペプチドS262を合成して抗体anti-PS262の特異性を評価したところ、S262を 2000fmol/ml の濃度まで添加してもカウントが低下せず、本発明における抗体は、リン酸化セリンを含むPS262を特異的に認識していることが判明した。

(3) 患者脳脊髄液中のリン酸化タウ蛋白の測定

(2) の手法および検量線を用いて、アルツハイマー病患者 (AD) 8 名の脳脊髄液中のリン酸化タウ蛋白濃度を測定した。コントロール (CTL) として非痴呆患者 7 名の脳脊髄液中のリン酸化タウ蛋白濃度を測定した。結果を図 6 に示す。図 6 に示されるとおり、CTL ではいずれもリン酸化タウ蛋白が検出されなかったのに対し、AD では $45 \sim 76 \text{ fmol/ml}$ のリン酸化タウ蛋白が検出された。

産業上の利用可能性

本発明によれば、PHF 中のリン酸化タウ蛋白のリン酸化部位を含む部分ペプチドを免疫原として用いてリン酸化タウ蛋白を特異的に認識する抗体を提供することができる。また、得られた抗体を用いて脳抽出液、組織切片中のリン酸化タウ蛋白を確認することができる。更に、この抗体を用いる本発明のリン酸化タウ蛋白の測定方法は、体液中のリン酸化タウ蛋白を簡便に測定することが可能であり、アルツハイマー病の検出に有用である。

配列表

(1) 一般情報

(i) 出願人： 三菱化学株式会社

(ii) 発明の名称： 抗リン酸化タウ蛋白抗体及びそれを用いるアルツハイマー病の検出方法

(iii) 配列数： 22

(vi) 現行出願データ

(A) 出願番号

(B) 出願日

(C) 分類

(vi) 先の出願データ

(A) 出願番号： JP 8/56090

(B) 出願日： 13-MAR-1996

(2) 配列番号 1 の配列の情報：

(i) 配列の性質：

(A) 配列の長さ： 441 amino acids

(B) 配列の型： アミノ酸

(C) 鎖の数： 一本鎖

(D) トポロジー： 直鎖状

(ii) 配列の種類： タンパク質

(xi) 配列： SEQ ID NO:1:

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly

1 5 10 15

Gln Asp Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr

20 25 30

Met His Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu

35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
 50 55 60
 Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
 65 70 75 80
 Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
 85 90 95
 Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
 100 105 110
 Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
 115 120 125
 Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
 130 135 140
 Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
 145 150 155 160
 Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
 165 170 175
 Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
 180 185 190
 Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 195 200 205
 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 210 215 220
 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 225 230 235 240
 Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
 245 250 255
 Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 260 265 270

Gly	Lys	Val	Gln	Ile	Ile	Asn	Lys	Lys	Leu	Asp	Leu	Ser	Asn	Val	Gln
		275					280					285			
Ser	Lys	Cys	Gly	Ser	Lys	Asp	Asn	Ile	Lys	His	Val	Pro	Gly	Gly	Gly
		290					295					300			
Ser	Val	Gln	Ile	Val	Tyr	Lys	Pro	Val	Asp	Leu	Ser	Lys	Val	Thr	Ser
305					310				315					320	
Lys	Cys	Gly	Ser	Leu	Gly	Asn	Ile	His	His	Lys	Pro	Gly	Gly	Gly	Gln
				325				330						335	
Val	Glu	Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Leu	Asp	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Gln	Ser
			340					345					350		
Lys	Ile	Gly	Ser	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	His	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn
		355					360					365			
Lys	Lys	Ile	Glu	Thr	His	Lys	Leu	Thr	Phe	Arg	Glu	Asn	Ala	Lys	Ala
		370					375				380				
Lys	Thr	Asp	His	Gly	Ala	Glu	Ile	Val	Tyr	Lys	Ser	Pro	Val	Val	Ser
385					390					395				400	
Gly	Asp	Thr	Ser	Pro	Arg	His	Leu	Ser	Asn	Val	Ser	Ser	Thr	Gly	Ser
				405					410					415	
Ile	Asp	Met	Val	Asp	Ser	Pro	Gln	Leu	Ala	Thr	Leu	Ala	Asp	Glu	Val
			420					425					430		
Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Lys	Gln	Gly	Leu							
		435					440								

(2) 配列番号 2 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 12 amino acids
- (B) 配列の型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号:

(B) 存在位置: 6

(D) 他の情報: Xaa = phosphoserine

(xi) 配列: SEQ ID NO:2:

Lys Ser Gly Tyr Ser Xaa Pro Gly Ser Pro Gly Thr
1 5 10

(2) 配列番号 3 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 13 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号:

(B) 存在位置: 6

(D) 他の情報: Xaa = phosphoserine

(xi) 配列: SEQ ID NO:3:

Lys Ser Ser Pro Gly Xaa Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg
1 5 10

(2) 配列番号 4 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 12 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号:

(B) 存在位置: 7

(D) 他の情報: Xaa = phosphothreonine

(xi) 配列: SEQ ID NO:4:

Cys Pro Gly Ser Pro Gly Xaa Pro Gly Ser Arg Ser

1

5

10

(2) 配列番号 5 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 13 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号:

(B) 存在位置: 6

(D) 他の情報: Xaa = phosphoserine

(xi) 配列: SEQ ID NO:5:

Lys Ser Xaa Pro Gly Xaa Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg

1

5

10

(2) 配列番号 6 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 14 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号:

(B) 存在位置: 7

(D) 他の情報: Xaa=phosphothreonine

(xi) 配列: SEQ ID NO:6:

Cys Val Ala Val Val Arg Xaa Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser
1 5 10

(2) 配列番号 7 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 12 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号:

(B) 存在位置: 7

(D) 他の情報: Xaa=phosphoserine

(xi) 配列: SEQ ID NO:7:

Cys Arg Thr Pro Pro Lys Xaa Pro Ser Ser Ala Lys
1 5 10

(2) 配列番号 8 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 12 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号:

(B) 存在位置: 7

(D) 他の情報: Xaa = phosphoserine

(xi) 配列: SEQ ID NO:8:

Cys Arg Thr Pro Pro Lys Xaa Pro Ser Ala Ser Lys
1 5 10

(2) 配列番号 9 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 12 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号:

(B) 存在位置: 3

(D) 他の情報: Xaa = phosphothreonine

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号:

(B) 存在位置: 7

(D) 他の情報: Xaa = phosphoserine

(xi) 配列: SEQ ID NO:9:

Cys Arg Xaa Pro Pro Lys Xaa Pro Ser Ser Ala Lys
1 5 10

(2) 配列番号10の配列の情報:

(i) 配列の性質:

- 32 -

- (A) 配列の長さ: 12 amino acids
- (B) 配列の型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: ペプチド
- (ix) 配列の特徴:
 - (A) 特徴を表す記号:
 - (B) 存在位置: 7
 - (D) 他の情報: Xaa = phosphoserine

(xi) 配列: SEQ ID NO:10:

Cys Lys Ser Lys Ile Gly Xaa Thr Glu Asn Leu Lys
1 5 10

(2) 配列番号11の配列の情報:

- (i) 配列の性質:
 - (A) 配列の長さ: 12 amino acids
 - (B) 配列の型: アミノ酸
 - (C) 鎖の数: 一本鎖
 - (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: ペプチド
- (ix) 配列の特徴:
 - (A) 特徴を表す記号:
 - (B) 存在位置: 7
 - (D) 他の情報: Xaa = phosphoserine

(xi) 配列: SEQ ID NO:11:

Cys Glu Ile Val Tyr Lys Xaa Pro Val Val Ser Gly
1 5 10

(2) 配列番号12の配列の情報:

- (i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 12 amino acids
- (B) 配列の型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: ペプチド
- (ix) 配列の特徴:
 - (A) 特徴を表す記号:
 - (B) 存在位置: 7
 - (D) 他の情報: Xaa = phosphoserine

(xi) 配列: SEQ ID NO:12:

Cys Val Ser Gly Asp Thr Xaa Pro Arg His Leu Ser
1 5 10

(2) 配列番号13の配列の情報:

- (i) 配列の性質:
 - (A) 配列の長さ: 12 amino acids
 - (B) 配列の型: アミノ酸
 - (C) 鎖の数: 一本鎖
 - (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: ペプチド
- (ix) 配列の特徴:
 - (A) 特徴を表す記号:
 - (B) 存在位置: 7
 - (D) 他の情報: Xaa = phosphoserine

(xi) 配列: SEQ ID NO:13:

Lys Leu Ser Asn Val Ser Xaa Thr Gly Ser Ile Asp
1 5 10

(2) 配列番号14の配列の情報:

- (i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 12 amino acids
- (B) 配列の型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(ix) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表す記号:
- (B) 存在位置: 7
- (D) 他の情報: Xaa = phosphoserine

(xi) 配列: SEQ ID NO:14:

Cys Ile Asp Met Val Asp Xaa Pro Gln Leu Ala Thr

1 5 10

(2) 配列番号15の配列の情報:

(i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 12 amino acids
- (B) 配列の型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(ix) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表す記号:
- (B) 存在位置: 6
- (D) 他の情報: Xaa = phosphoserine

(xi) 配列: SEQ ID NO:15:

Lys Leu Ser Asn Val Xaa Ser Thr Gly Ser Ile Asp

1 5 10

(2) 配列番号16の配列の情報:

(i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 12 amino acids
- (B) 配列の型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: ペプチド
- (ix) 配列の特徴:
 - (A) 特徴を表す記号:
 - (B) 存在位置: 6
 - (D) 他の情報: Xaa = phosphoserine
- (ix) 配列の特徴:
 - (A) 特徴を表す記号:
 - (B) 存在位置: 7
 - (D) 他の情報: Xaa = phosphoserine

(xi) 配列: SEQ ID NO:16:

Lys Leu Ser Asn Val Xaa Xaa Thr Gly Ser Ile Asp

1 5 10

(2) 配列番号17の配列の情報:

- (i) 配列の性質:
 - (A) 配列の長さ: 17 amino acids
 - (B) 配列の型: アミノ酸
 - (C) 鎖の数: 一本鎖
 - (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO:17:

Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys

1 5 10 15

(2) 配列番号18の配列の情報:

- (i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 12 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO:18:

Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Cys

1 5 10

(2) 配列番号19の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 15 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO:19:

Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys

1 5 10 15

(2) 配列番号20の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 34 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO:20:

Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro

1 5 10 15

Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu
 20 25 30
 Pro Lys

(2) 配列番号21の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 55 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO:21:

Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val
 1 5 10 15
 Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly
 20 25 30
 Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu
 35 40 45
 Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys
 50 55

(2) 配列番号22の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 12 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO:22:

Cys Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys
 1 5 10

請求の範囲

1. ペアード・ヘリカル・フィラメント (Paired Helical Filament) 中のリン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位を含む部分ペプチドを免疫原とする抗体。
2. リン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位が、配列表の配列番号 1 で表されるアミノ酸配列中の 198 番目のセリン、199 番目のセリン、202 番目のセリン、205 番目のスレオニン、231 番目のスレオニン、235 番目のセリン、262 番目のセリン、396 番目のセリン、403 番目のスレオニン、404 番目のセリン、409 番目のセリン、412 番目のセリン、413 番目のセリン及び 422 番目のセリンから選ばれる 1 以上のアミノ酸である請求項 1 に記載の抗体。
3. リン酸化タウ蛋白質のリン酸化部分が、配列表の配列番号 1 で表されるアミノ酸配列中の 199 番目のセリン、202 番目のセリン、205 番目のスレオニン、231 番目のスレオニン、235 番目のセリン、262 番目のセリン、396 番目のセリン、404 番目のセリン、412 番目のセリン、413 番目のセリン及び 422 番目のセリンから選ばれる 1 以上のアミノ酸である請求項 1 に記載の抗体。
4. リン酸化部位を含む部分ペプチドがそのリン酸化部位のアミノ酸残基とその前および／または後の複数個のアミノ酸残基を含むペプチドである請求項 1 から 3 のいずれかに記載の抗体。
5. リン酸化部位を含む部分ペプチドが配列表の配列番号 2 から 16 のいずれかに記載のアミノ酸配列で表される請求項 1 から 4 のいずれかに記載の抗体。
6. 少なくとも、請求項 1～5 のいずれかに記載の抗体よりなる、アルツハイマー病の検出に用いるための試薬キット。
7. 請求項 1～5 のいずれかに記載の抗体と、アルツハイマー病の疑いのある個体から得られた試料との反応性を調べることを特徴とするアルツハイマー病の検出方法。

1 / 6

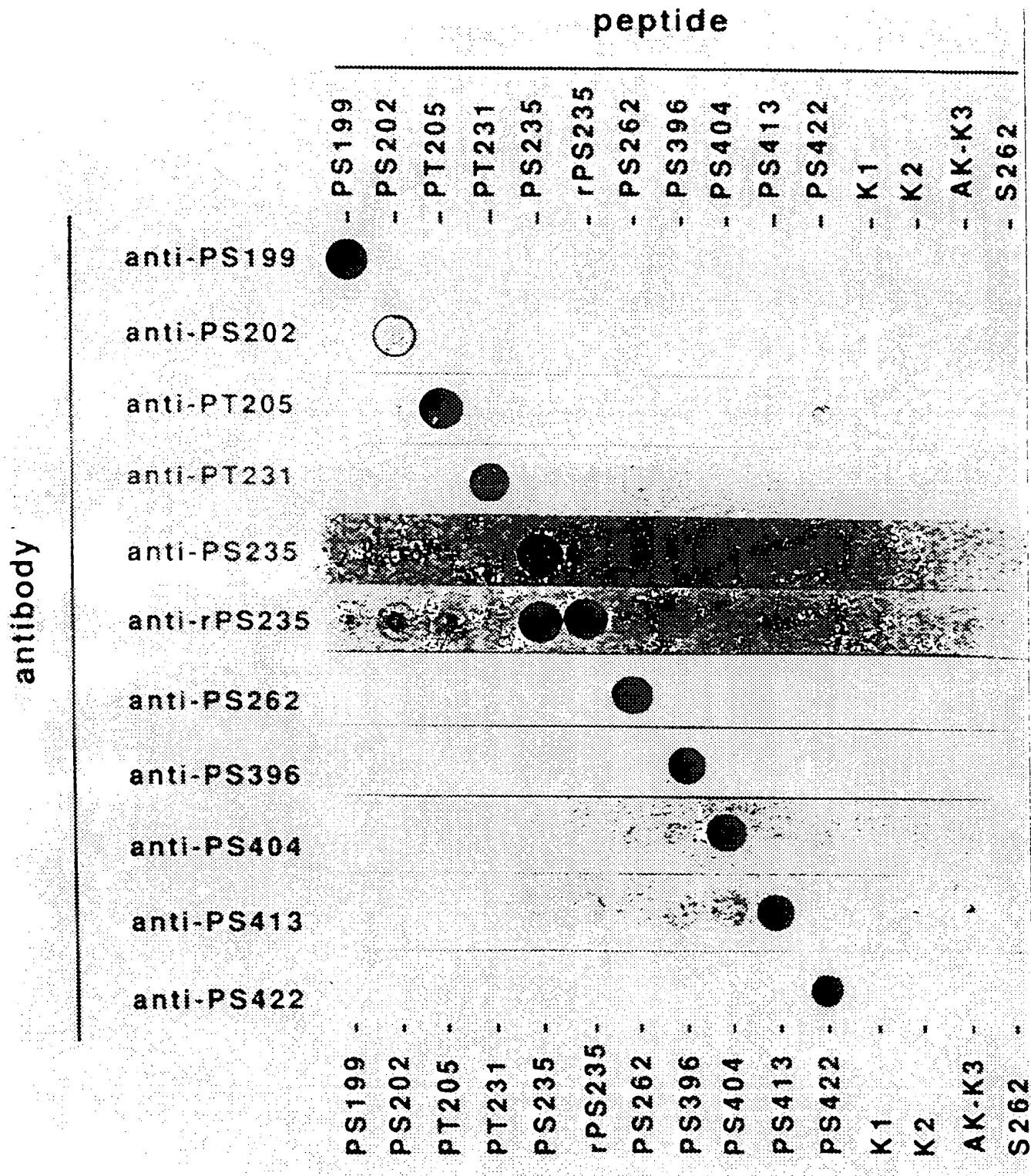


FIG. 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TS

FIG. 2

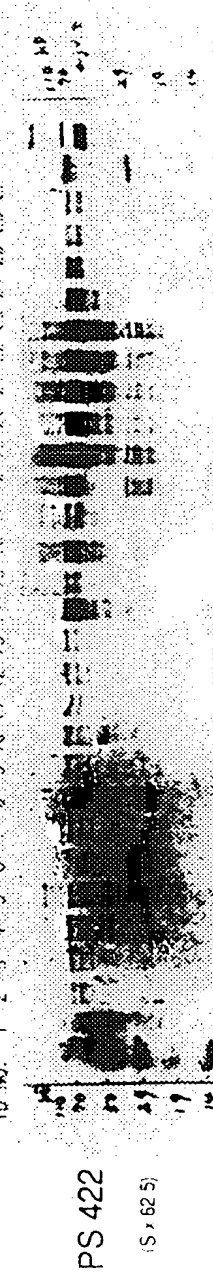
AD/N A A A A N N N N N N N A A A A A A A A A A
 PHF 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27



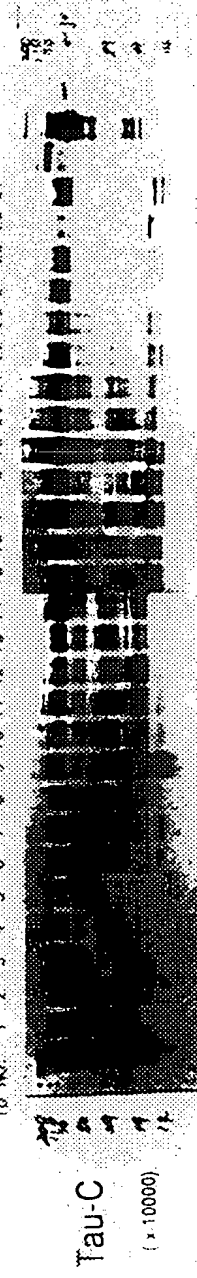
ID No. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27



ID No. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27



ID No. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27



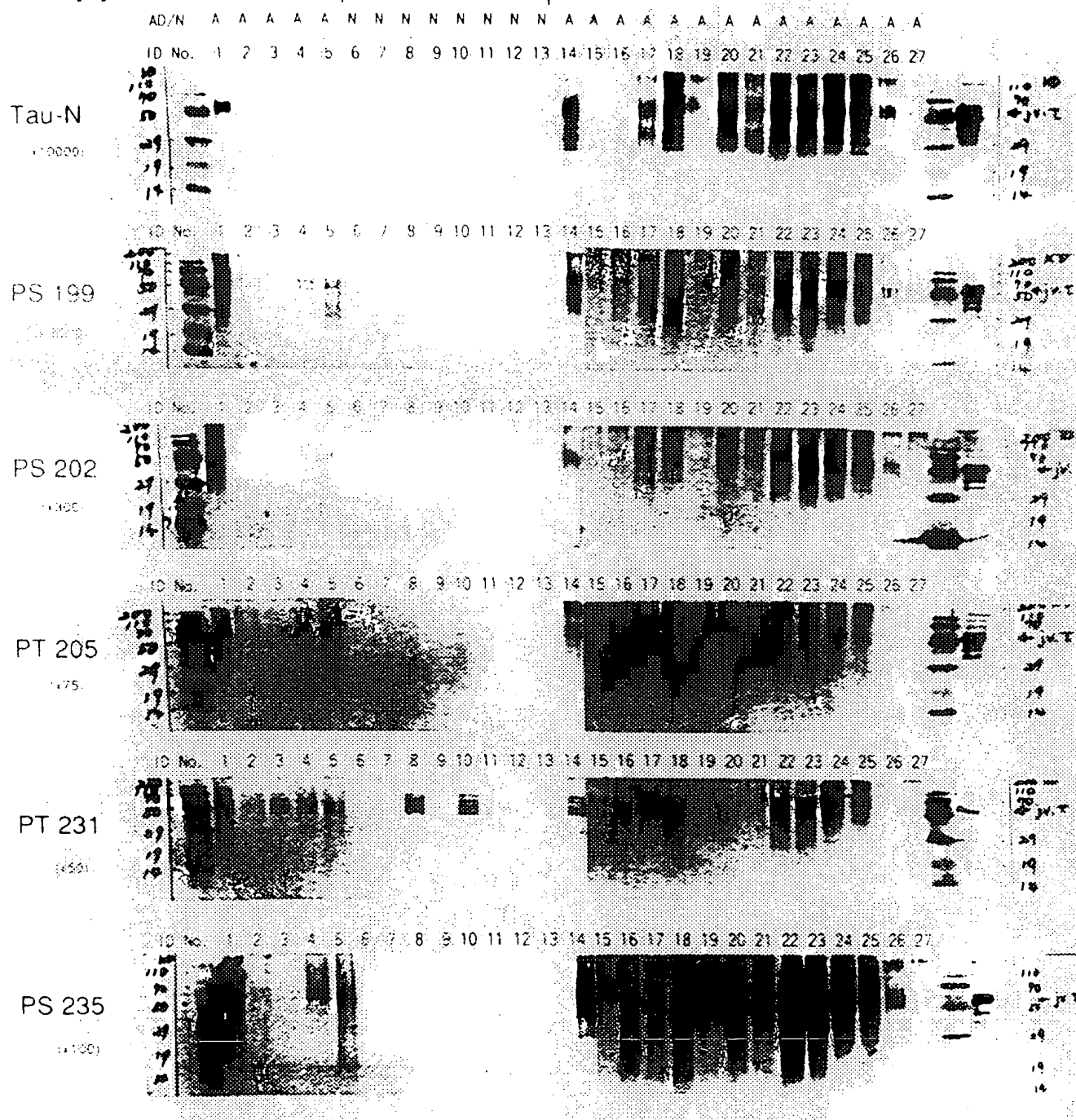
ID No. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3 / 6

FIG. 3

SDSppt

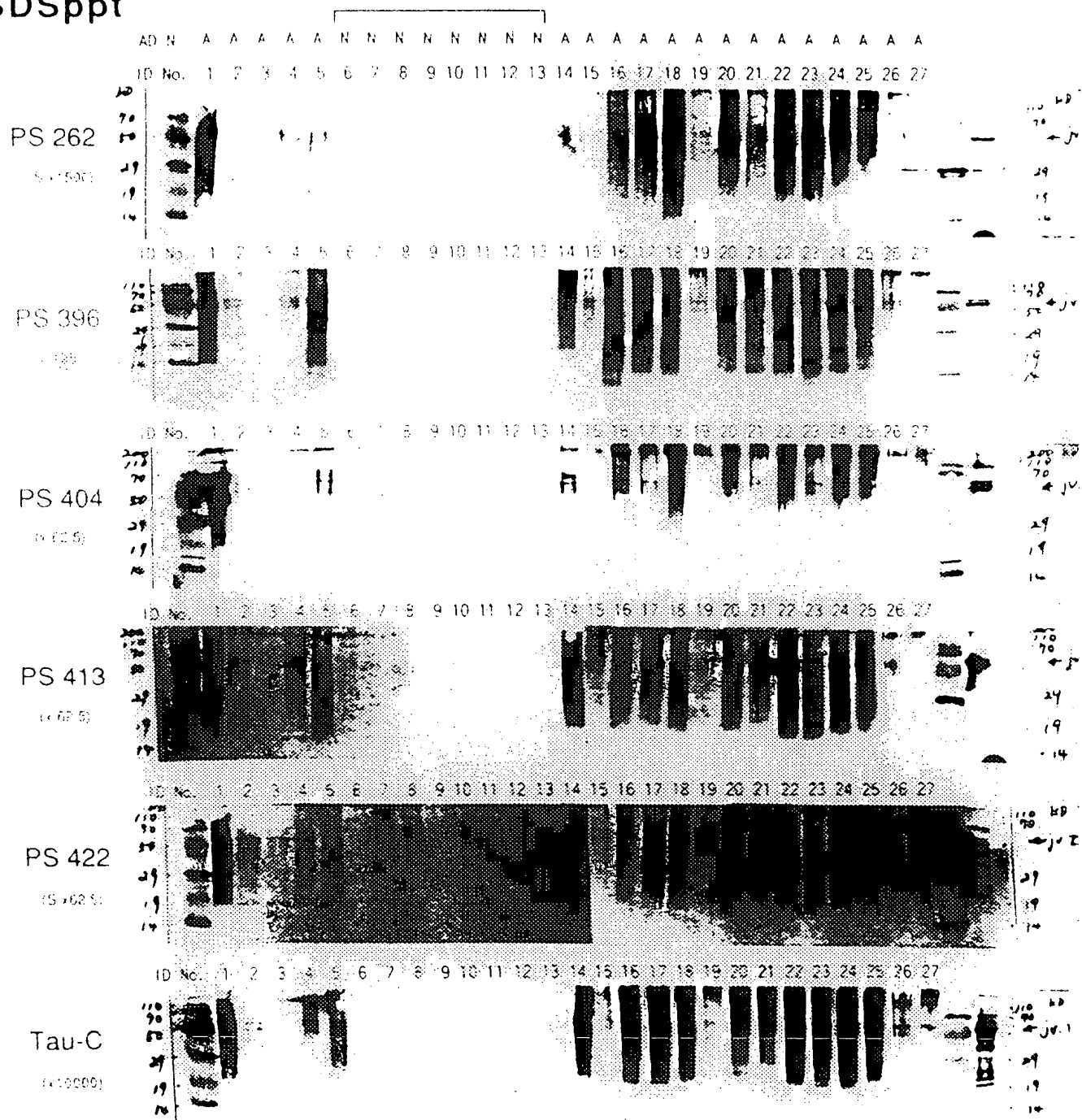


THIS PAGE BLANK (USPTO)

4 / 6

FIG. 4

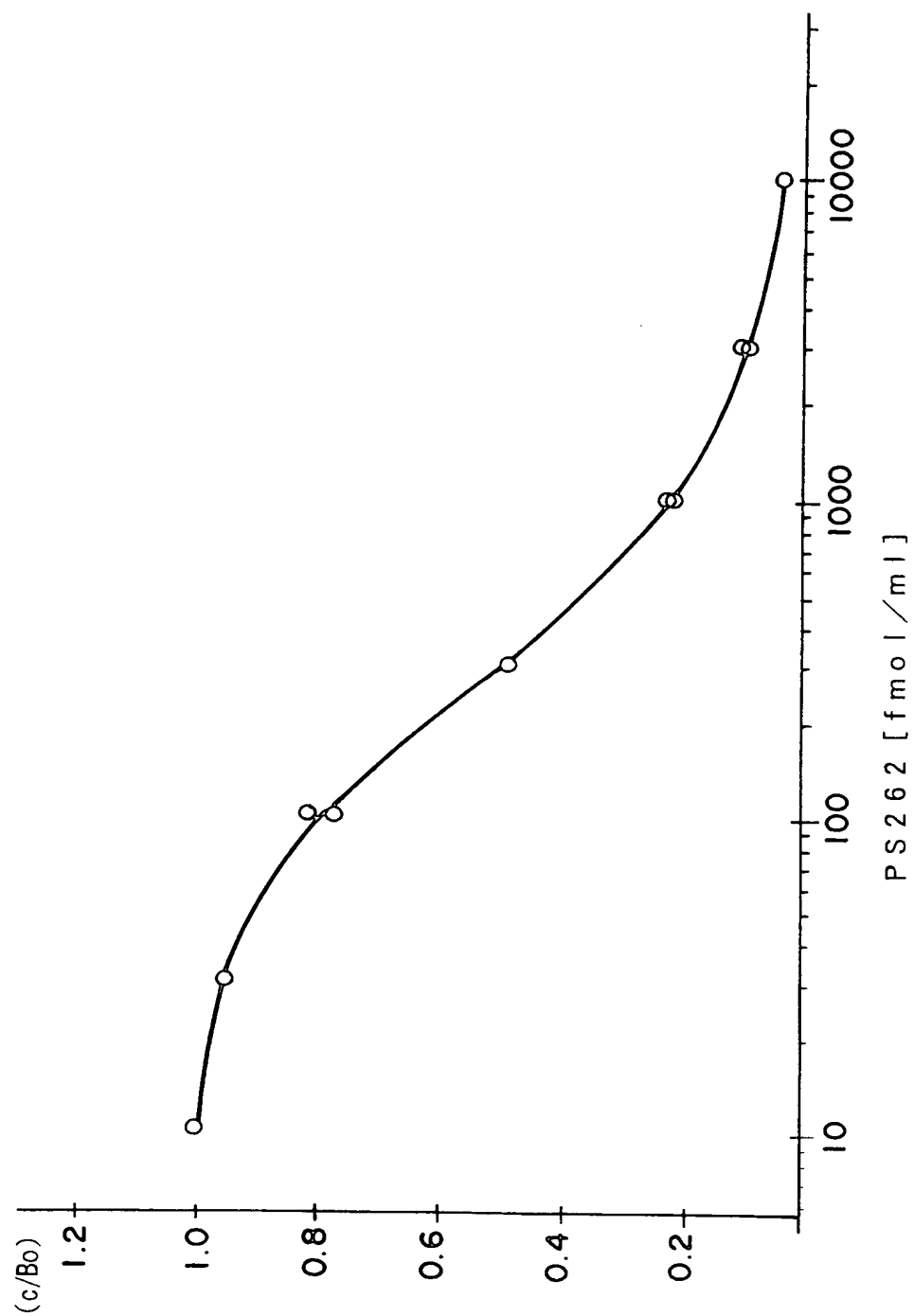
SDSppt



THIS PAGE BLANK (USPTO)

5 / 6

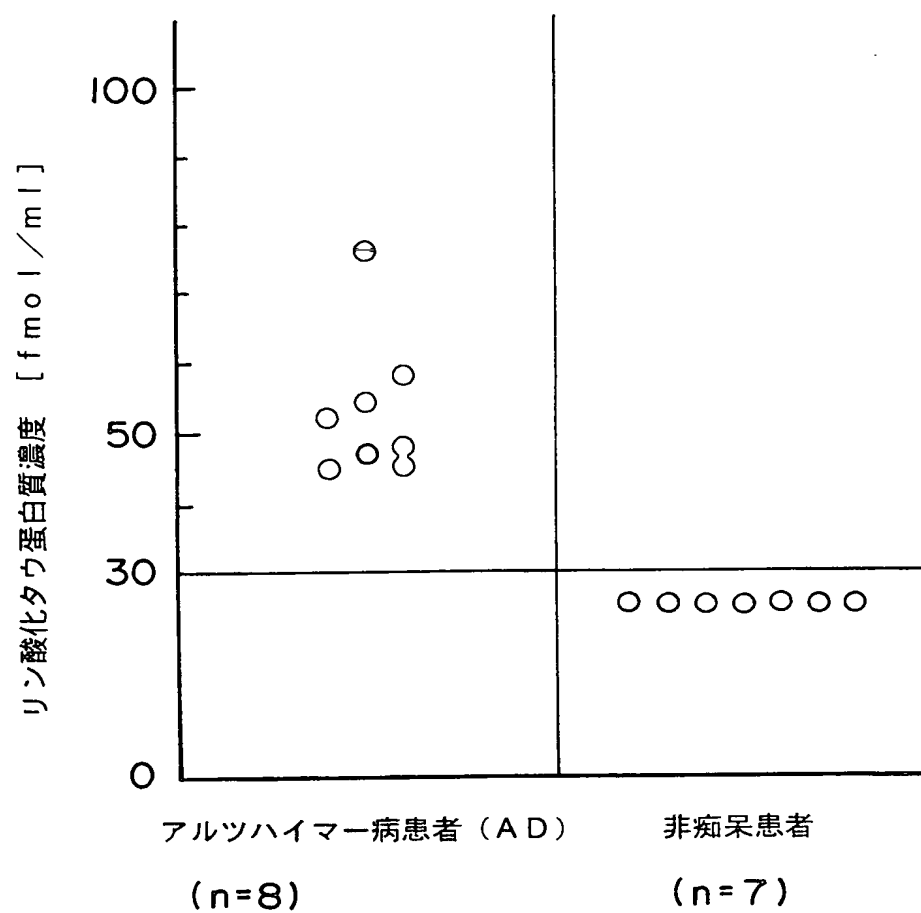
FIG. 5



THIS PAGE BLANK (USPTO)

6 / 6

FIG. 6



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00804

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ G01N33/53, C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926 - 1996
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971 - 1996
Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994 - 1997

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 89 (1992) B. Lichtenberg-Kraag "Phosphorylation-dependent epitopes of neurofilament antibodies on tau protein and relationship with Alzheimer tau" p. 5384-5388 ABSTRACT	1 - 7
X	Neurobiology of Aging, Vol. 16, No. 3 (1995) R. Nuydens "Neuronal Kinase Stimulation Leads to Aberrant Tau Phosphorylation and Neurotoxicity" p. 465-477 ABSTRACT	1 - 7
X	Biochemical Journal, Vol. 301 (1994) M. Goedert "Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease" p. 871-877 ABSTRACT	1 - 7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

March 27, 1997 (27. 03. 97)

Date of mailing of the international search report

April 8, 1997 (08. 04. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ G01N33/53, C07K16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-1996年

日本国登録実用新案公報 1994-1997年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Proc.Natl.Acad.Sci., 第89巻(1992) B.Lichtenberg-Kraag "Phosphorylation-dependent epitopes of neurofilament antibodies on tau protein and relationship with Alzheimer tau" p5384-5388 ABSTRACT	1-7
X	Neurobiology of Aging, 第16巻第3号 (1995) R.Nuydens "Neuronal Kinase Stimulation Leads to Aberrant Tau Phosphorylation and Neurotoxicity" p465-477 ABSTRACT	1-7
X	Biochemical Journal, 第301巻 (1994) M.Goedert "Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease" p871-877 ABSTRACT	1-7

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27.03.97

国際調査報告の発送日

08.04.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村祥子

2 J

9408

電話番号 03-3581-1101 内線3252

THIS PAGE BLANK (USPTO)

E P



P C T

特 許 協 力 条 約

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号	F 1 3 3 0 P C O P 5 3 7	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 9 7 / 0 0 8 0 5	国際出願日 (日.月.年) 1 3 . 0 3 . 9 7	優先日 (日.月.年) 2 5 . 0 3 . 9 6	
出願人(氏名又は名称) 三井石油化学工業株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。
2. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。
3. ☐ この国際出願は、ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。
 - ☐ この国内出願と共に提出されたもの
 - ☐ 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの
 - ☐ しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を越える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない
 - ☐ この国際調査機関が書換えたもの
4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
 - ☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。
5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
 - ☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。
6. 要約書とともに公表される図は、
第 1 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。 ☐ なし
 - ☐ 出願人は図を示さなかった。
 - ☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ B29C47/20

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ B29C47/00-47/96

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1997年
日本国公開実用新案公報 1971-1997年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P, 4-135731, A (三菱樹脂株式会社), 11. 5月. 1992 (11. 05. 92), 図1 (ファミリーなし)	1-8
A	J P, 4-33246, B2 (キョーラク株式会社), 02. 6月. 1992 (02. 06. 92), 第4欄第9-12行, 図1 (ファミリーなし)	1-8
A	J P, 45-36437, B1 (住友化学工業株式会社), 19. 11月. 1970 (19. 11. 70), 図面 (ファミリーなし)	1-8

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01. 04. 97

国際調査報告の発送日

08.04.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 弘樹

4 F

9349

電話番号 03-3581-1101 内線 3430

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

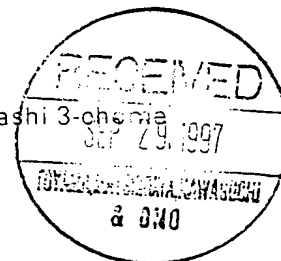
NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TOYAMA, Tsutomu
Yokoyama Building
6th floor
4-10, Higashi Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku
Tokyo 103
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 18 September 1997 (18.09.97)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference 97021PCOP551			
International application No. PCT/JP97/00304	International filing date (day/month/year) 13 March 1997 (13.03.97)	Priority date (day/month/year) 13 March 1996 (13.03.96)	
Applicant MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
CA,EP,JP,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
None

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a)-(c)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 18 September 1997 (18.09.97) under No. WO 97/34145

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 97021PCOP551	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP97/00804	International filing date (<i>day/month/year</i>) 13 March 1997 (13.03.1997)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 13 March 1996 (13.03.1996)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/53, C07K 16/18		
Applicant mitsubishi chemical corporation		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 13 March 1997 (13.03.1997)	Date of completion of this report 26 June 1997 (26.06.1997)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP97/00804

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed", and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☒ the international application as originally filed.
- ☐ the description, pages _____, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the drawings, sheets/fig _____, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP97/00804

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-7	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-7	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-7	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The subject matters of claims 1 to 5 do not involve an inventive step in view of document 1 (Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 89 (1992), p. 5384-5388), document 2 (Neurobiology of Aging, Vol. 16, No. 3 (1995), p. 465-477) and document 3 (Biochemical Journal, Vol. 301 (1994), p. 871-877) cited in the international search report. Document 1 discloses antibodies containing as an epitope serine 396 and serine 404, among the phosphorylated sites of a phosphorylated tau protein; document 2 discloses antibodies containing as an epitope serine 396, serine 199 and serine 202; and document 3 discloses antibodies containing as an epitope threonine 181 and threonine 231. It is obvious to a person skilled in the art to use a partial peptide containing the epitope as an immunogen in producing such an antibody.

The subject matters of claims 6 and 7 do not involve an inventive step in view of documents 1 to 3 cited in the international search report. Documents 1 to 3 disclose that the phosphorylated tau protein content in PHF correlates to Alzheimer's disease. Therefore, it is obvious to a person skilled in the art to detect Alzheimer's disease by using an antibody against a phosphorylated tau protein in PHF.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
(P C T 36条及びP C T 規則70)

REC'D 14 JUL. 1997

WIPO PCT

18/9
446

出願人又は代理人 の書類記号 97021PCOP551	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 97/00804	国際出願日 (日.月.年) 13.03.97	優先日 (日.月.年) 13.03.96
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁸ G01N33/53, C07K16/18		
出願人 (氏名又は名称) 三菱化学株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT 36条) の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT 規則70.16及びPCT 実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I ☒ 国際予備審査報告の基礎II ☐ 優先権III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成IV ☐ 発明の単一性の欠如V ☒ PCT 35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明VI ☐ ある種の引用文献VII ☐ 国際出願の不備VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 13.03.97	国際予備審査報告を作成した日 26.06.97	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100 東京都千代田区鼠が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 山村祥子 電話番号 03-3581-1101 内線3252	2 J 9408

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とする)

☒ 出願時の国際出願書類

<input type="checkbox"/> 明細書	第	_____	ページ、	出願時のもの
明細書	第	_____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書	第	_____	ページ、	_____ 付の書簡と共に提出されたもの
明細書	第	_____	ページ、	_____ 付の書簡と共に提出されたもの

<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第	_____	項、	出願時に提出されたもの
請求の範囲	第	_____	項、	PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲	第	_____	項、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲	第	_____	項、	_____ 付の書簡と共に提出されたもの
請求の範囲	第	_____	項、	_____ 付の書簡と共に提出されたもの

<input type="checkbox"/> 図面	第	_____	ページ/図、	出願時に提出されたもの
図面	第	_____	ページ/図、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面	第	_____	ページ/図、	_____ 付の書簡と共に提出されたもの
図面	第	_____	ページ/図、	_____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 補正により、下記の書類が削除された。

<input type="checkbox"/> 明細書	第	_____	ページ
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第	_____	項
<input type="checkbox"/> 図面	第	_____	ページ/図

3. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

4. 追加の意見(必要ならば)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1-7

有

請求の範囲

無

進歩性(I S)

請求の範囲

有

請求の範囲 1-7

無

産業上の利用可能性(I A)

請求の範囲 1-7

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明

請求の範囲1-5は、国際調査で引用された文献1(Proc.Natl.Acad.Sci., 第89巻(1992) p5384-5388)、文献2(Neurobiology of Aging, 第16巻第3号(1995) p465-477)、文献3(Biochemical Journal, 第301巻(1994) p871-877)により進歩性を有しない。文献1にはPHF中のリン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位の内、セリン396、セリン404をエピトープとする抗体について、文献2にはセリン396、セリン199、セリン202をエピトープとする抗体について、文献3にはスレオニン181、スレオニン231をエピトープとする抗体について記載されている。これらの抗体を作製する際に、エピトープを含む部分ペプチドを免疫原とすることは、当業者にとって自明である。

請求の範囲6、7は、国際調査で引用された文献1-3により進歩性を有しない。文献1-3にはPHF中のリン酸化タウ蛋白質とアルツハイマー病との間に相関関係が存在することについて記載されており、PHF中のリン酸化タウ蛋白質に対する抗体を使用してアルツハイマー病の検出を行うことは、当業者にとって自明である。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

EP



特 許 協 力 条 約

PCT

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
〔PCT 18 条、PCT 規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 97021PCOP551	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 97/00804	国際出願日 (日.月.年) 17.03.97	優先日 (日.月.年) 13.03.96
出願人(氏名又は名称) 三菱化学株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT 18 条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。
2. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。
3. ☐ この国際出願は、ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。
 - ☐ この国際出願と共に提出されたもの
 - ☐ 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの
 - ☐ しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を越える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない
 - ☐ この国際調査機関が書換えたもの
4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT 規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。
6. 要約書とともに公表される図は、
第 1 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。 ☐ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ G01N33/53, C07K16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-1996年

日本国登録実用新案公報 1994-1997年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Proc. Natl. Acad. Sci., 第89巻(1992) B. Lichtenberg-Kraag "Phosphorylation-dependent epitopes of neurofilament antibodies on tau protein and relationship with Alzheimer tau" p5384-5388 ABSTRACT	1-7
X	Neurobiology of Aging, 第16巻第3号 (1995) R. Nuydens "Neuronal Kinase Stimulation Leads to Aberrant Tau Phosphorylation and Neurotoxicity" p465-477 ABSTRACT	1-7
X	Biochemical Journal, 第301巻 (1994) M. Goedert "Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease" p871-877 ABSTRACT	1-7

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
27.03.97

国際調査報告の発送日

08.04.97

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号特許庁審査官 (権限のある職員)
山村祥子

2 J 9408

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑤ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 平成4年(1992)5月11日

// B 29 C 47/88
B 29 L 23:00

7717-4F

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全3頁)

⑥ 発明の名称 熱可塑性樹脂管の製造方法

⑪ 特 願 平2-258388

⑫ 出 願 平2(1990)9月27日

⑬ 発 明 者 相 本 義 昭 神奈川県平塚市真土2480番地 三菱樹脂株式会社平塚工場
内

⑭ 出 願 人 三菱樹脂株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

⑮ 代 理 人 弁理士 近藤 久美

明 細 書

1 発 明 の 名 称

熱可塑性樹脂管の製造方法

2 特許請求の範囲

押出機の先端に設けた口金から押出した熔融樹脂管を内外周面から冷却して熱可塑性樹脂管を製造するにあたり、前記熔融樹脂管の内周側に管内周面と弾性的に接触する当接部材を配設し、該当接部材と管内周面との間に冷媒を強制的に通過させて熔融樹脂管の内周面を冷却すると共に、該樹脂管を冷却水槽内に潜らせて外周面を冷却水で冷却することを特徴とする熱可塑性樹脂管の製造方法。

3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、口金から押出した熔融樹脂管を内外周面から効果的に冷却して、管壁に歪みが発生するのを防止した熱可塑性樹脂管の製造方法に関する。

(従来の技術とその課題)

一般に、塩化ビニル樹脂、ポリエチレン樹脂等の熱可塑性樹脂管を製造する場合、口金から押出した熔融樹脂管を冷却水槽内に潜らせて外周面を冷却水で冷却することが行なわれている。

ところが、熔融樹脂管を外周側から冷却するだけでは、管の内周面と外周面との温度差が大きいために管壁の厚方向に温度勾配ができる。このため、成形された熱可塑性樹脂管の管壁に肉厚方向の歪が発生して管が変形したり、振動・衝撃等の外力が作用したときに管が破損し易いという問題があった。

そこで、口金から押出された熔融樹脂管を管外周側から冷却するだけでなく、管内周側からも冷却して管壁に歪が発生するのを防止する方法が種々提案されている。

例えば、特開昭50-112462号公報には、第4図に縦断面図で示した如く口金から押出された熔融樹脂管を管内周側から強制的に冷却する方法が提案されている。これを同図に基づいて簡単

THIS PAGE BLANK (USPTO)

に説明すると、口金から押出された溶融樹脂管の内周側には供給管3aが配設されており、該供給管3aの外周面には軸方向に所定間隔をもつて複数のディスク31aが設けられている。また供給管3aの外周面には多数の小孔32aが設けられており、該小孔32aから噴出した水、空気等の冷媒が溶融樹脂管の内周面とディスク31aの外周面との間を通過した後、供給管3a内に挿通されている導管4aを通過して排出されるようになっている。この冷却方法の場合には、水、空気等の冷媒が溶融樹脂管の内周面とディスクの外周面との間を勢よく通過するので、単に溶融樹脂管の内周側で冷媒を循環させる場合よりも冷却効果が期待できるものの充分ではなかった。

本発明は、かかる課題を解決したものであつて、溶融樹脂管を内外周面から効果的に冷却でき、管壁に歪が発生することのない熱可塑性樹脂管の製造方法を提供するものである。

(課題を解決するための手段)

本発明は、口金から押出された溶融樹脂管の内

周側に管内周面と弾性的に接触する当接部材を配設し、該当接部材と管内周面との間に冷媒を強制的に通過させて溶融樹脂管の内周面を冷却すると共に、該樹脂管を冷却水槽内に潜らせて外周面を冷却水で冷却することの特徴とするものである。
(作 用)

口金から押出された溶融樹脂管の内周面と、該管内周面と弾性的に接触している当接部材との間に冷媒を強制的に通過させると、管内周面と当接部材との間に周方向に亘ってほぼ一定の隙間ができ、この狭い隙間を冷媒が勢よく通過する間に溶融樹脂管の内周面が冷却され、これと同時に溶融樹脂管の外周面が冷却水によつて冷却される。
(実施例)

以下、本発明の実施例を図面にて詳細に説明する。第1図は本発明で用いられる製造装置の一実施例を示す縦断面図、第2図および第3図は他の実施例を示す要部断面図である。まず第1図に示した装置の概略を説明すると、図中符号1は口金であつて、該口金1は押出機(図示せず)の先端

に設けられている。口金1を形成するダイリング11とマンドレル12との間には環状の樹脂通路13が設けられており、該樹脂通路13から溶融樹脂管2が押出成形される。

マンドレル12の内部は空洞となつており、該空洞内には水、空気等の冷媒を前記溶融樹脂管2の内周側に導入するための供給管3と、昇温した使用済みの冷媒を排出するための導管4とが配管されている。またマンドレル12の先端部には断熱および防水用の遮蔽板5が設けられており、該遮蔽板5を貫通した供給管3の先端にゴム等の弾性部材からなる円筒状のバック(当接部材)6が設けられている。バック6の外径は溶融樹脂管2の内径とほぼ同径となつており、その外周面には多数の小孔61が穿設されている。また、該バック6の他端には連結部材71を介して溶融樹脂管2の内周面と密接する遮蔽板7が設けられている。一方、溶融樹脂管2の外周側には冷却水槽8が設けられており、該冷却水槽8内を潜って通過する間に溶融樹脂管2の外周面が槽内の冷却水と接触

して冷却されるようになっている。

この実施例の場合、供給管3からバック6内に冷媒が導入されたとき、該バック6の外周面が溶融樹脂管2の内周面と弾性的に接触する。そして、バック6の外周面に穿設された多数の小孔61から冷媒が噴出したとき、溶融樹脂管2の内周面とバック6の外周面との間に周方向に亘って均一な隙間ができ、この狭い隙間を冷媒が勢よく通過することによつて溶融樹脂管2の内周面が冷却される。一方、昇温した使用済みの冷媒はバック6の後方に設けた通孔62から導管4を介して排出される。これと同時に、溶融樹脂管2は冷却水槽8内を通過する間にその外周面が槽内の冷却水と接触して冷却され、溶融樹脂管2は内周面と外周面との温度がほぼ等しい状態で冷却されるので、管壁に歪みが発生することがない。

第2図に示した装置は、溶融樹脂管2の内周側に導管4と接続して導管40を設け、該導管40の外周面にゴム等の弾性部材からなるディスク(当接部材)6aを軸方向に所定間隔で多数突設

THIS PAGE BLANK (USPTO)

しその後方に遮蔽板7を設けたものであり、各ディスク6aの外周面は熔融樹脂管2の内周面と弾性的に接触している。供給管3から熔融樹脂管2の内周側に冷媒が導入されたとき、この冷媒は熔融樹脂管2の内周面とディスク6aの外周面の間の狭い隙間を勢よく次々と通過するため、熔融樹脂管2の内周面が効率よく冷却される。一方、昇温した使用済の冷媒は導管40に設けた通孔42から導管4を介して排出される。

第3図に示した装置は、ゴム等の弾性部材で形成した砲弾状のバック(当接部材)6bを熔融樹脂管2の内周側に配設してその後方に遮蔽板7を設けたものであり、導管9からバック6b内に圧力流体を導入したときその外周面が熔融樹脂管2の内周面と弾性的に接触する。そこで、供給管3から熔融樹脂管2内に冷媒を導入して該熔融樹脂管2の内周面とバック6bの外周面との間に勢よく冷媒を通過させると、熔融樹脂管2の内周面が効率よく冷却され、昇温した使用済の冷却媒体はバック6bの後方に設けた通孔42から導管4

を介して排出される。

(発明の効果)

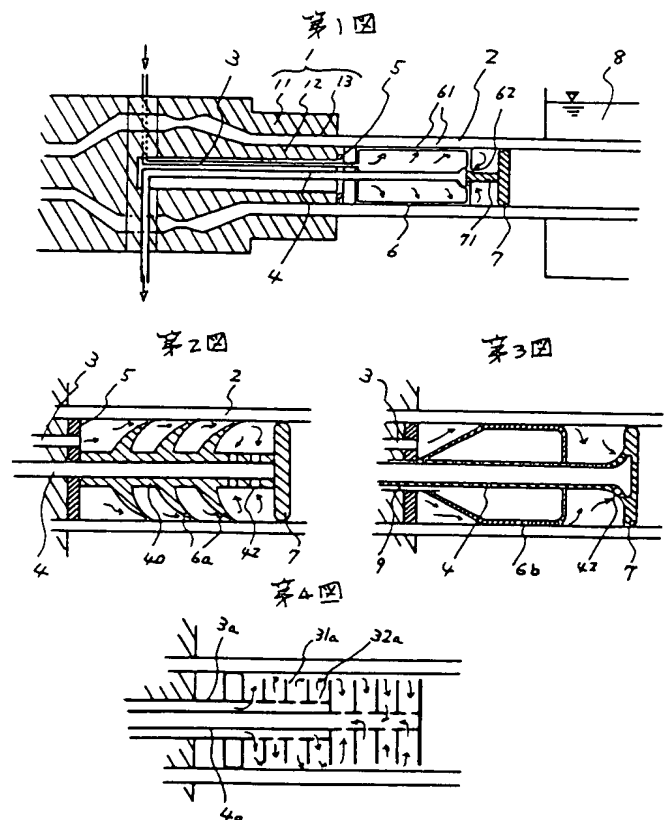
以上詳述した如く、本発明は口金から押出された熔融樹脂管の内周側に、該管内周面と弾性的に接触する当接部材を配設したので、熔融樹脂管の内周面と当接部材との間に冷媒を強制的に通過させたとき、管内周面と当接部材との間に管周方向に亘ってほぼ一定の隙間ができ、該隙間を冷媒が勢よく通過する。このため、流速の速い冷媒が熔融樹脂管の内周面と直接接して熔融樹脂管の内周面が効率よく冷却される。また、熔融樹脂管は冷却水相内を通過する間にその外周面が冷却水によつて冷却されるので、熔融樹脂管は内外周面から効果的に冷却され、管壁に残留歪が存在しない熱可塑性樹脂管が得られる。

4 図面の簡単な説明

第1図は本発明で用いられる熱可塑性樹脂管の製造装置を示す縦断面図、第2図および第3図は本発明の他の実施例を示す要部断面図、第4図は従来装置の要部を示す縦断面図である。

- | | |
|-----------------|----------------|
| 1 ……口金 | 11 ……ダイリング |
| 12 ……マンドレル | 2 ……熔融樹脂管 |
| 3 ……給水管 | 4 ……導管 |
| 5 ……遮蔽板 | 6 ……バック(当接部材) |
| 6a ……ディスク(当接部材) | 6b ……バック(当接部材) |
| 7 ……遮蔽板 | |

特許出願人 三菱樹脂株式会社
代理人 井理士 近 藤 久 美



THIS PAGE BLANK (CSPT0)

⑫ 特 許 公 報 (B 2)

平4-33246

⑬ Int. Cl. ⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公告 平成4年(1992)6月2日

B 29 B 11/10

7722-4F

B 29 C 47/22

7717-4F

47/92

7717-4F

49/04

2126-4F

49/78

2126-4F

// B 29 L 23:22

4F

発明の数 2 (全3頁)

⑮ 発明の名称 バリスンの押出方法及びその装置

⑯ 特 願 昭60-215958

⑰ 公 開 昭62-202713

⑱ 出 願 昭60(1985)9月28日

⑲ 昭62(1987)9月7日

⑳ 発 明 者 長 井 澄 雄 神奈川県相模原市東大沼4丁目4-8

㉑ 出 願 人 キョーラク株式会社 京都府京都市上京区烏丸通中立売下ル龍前町598番地の1

審 査 官 三 浦 均

1

2

㉒ 特許請求の範囲

1 ヘッド内に圧入された合成樹脂がヘッド内のダイとコアの間を通過する際にダイとコアとの間隔を変えてバリシンの肉厚を変化させるバリシンの押出方法において、押出時に合成樹脂の圧入速度を変化させこれによりコアに加わる軸線方向の力を変化させコアの上下動を制御してコアとダイの間隔を変えることを特徴とするバリシンの押出方法。

2 ダイ出口の形状が傾斜状であるダイとコアとの間隔をダイを上下動させることにより変化させてバリシンの肉厚を変化させるバリシンの押出装置において

外部から内部へ合成樹脂を導入する注入孔を備えるダイと

該ダイ内部にあつて同心状に上下に摺動可能な芯金と

該芯金の位置を弾発保持する弾機より構成されるバリシンの押出装置。

発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、バリシンの押出方法及びその装置に関するもので、さらに詳しくはヘッド内に圧入された合成樹脂の圧力によりダイとコアの間隔を変化させてバリシンの肉厚を制御するバリシンの押出方法及びその装置に関するものである。

従来の技術

ダイとコアの間隔を変化せさせてバリシンの肉厚を制御する技術は、例へば特開昭47-7137号公報に記載されているように予め設定されたプロファイルに従つて油圧によりコアを上下動させるものが一般的である。

従来の欠点

従来技術によれば、プロファイルを設定する電子プログラマー、プロファイルに従つてエネルギーを発生させるサーボ増巾器、ダイとコアの位置を電氣的にフィードバックするトランデューサーなど、各種の電子部品を使用してコアを上下動させるものである。これらは高価であるばかりでなく故障が多く、特に電氣的ショックに弱いという欠点を有している。

またこのような装置は高価であるのでバリシンの下端と上端だけを薄肉にしたいという基本的なバリシンの押出には経済的に使用できないものであつた。

問題点を解決するための手段及び作用

20 そこで本発明の押出方法として、

ヘッド内に圧入された合成樹脂がヘッド内のダイとコアの間を通過する際にダイとコアとの間隔を変えてバリシンの肉厚を変化させる押出方法において、押出時に合成樹脂の圧入速度を変化させこれによりコアに加わる軸線方向の力を変化させコアの上下動を制御してコアとダイの間隔を変えることを特徴とするバリシンの押出方法

THIS PAGE BLANK (USPTO)

としたことにより、圧入速度を変化させるだけで所望の肉厚のバリソンを得ることができ、成形品自体には含まれない捨てバリ部分の肉厚を輕易に薄くできるのである。

さらに本発明の製造装置によれば

ダイ出口の形状が傾斜状であるダイとコアの間隔をダイを上下動させることにより変化させてバリソンの肉厚を変化させるバリソンの押出装置において

外部から内部へ合成樹脂を導入する注入孔を備えるダイと

該ダイ内部にあつて同心状に上下に摺動可能な芯金と

該芯金の位置を弾発保持する弾機より成るバリソンの押出装置

としたので、導入される合成樹脂の速度を変化させるだけできわめて容易にバリソンの肉厚を制御することができ、押出装置自体もきわめて安価に形成でき、すべて機械的な制御であるので環境により装置が故障することがないのである。

実施例

本発明の実施例を第1図により説明する。1はダイでその上部に外部から内部へ合成樹脂を導入する注入孔1aを有する。この合成樹脂は押出機あるいはアキュムシリンダー（図示せず）よりアダプター2を通じて導入される。ダイ1内には芯金3が摺動自在に装着され、ダイ1内の芯金3にはマンドレル5が装着されている。マンドレル5の樹脂注入孔1aに相当する部分に円周状に環状溝5aが形成してある。芯金3の下端にはコア4が連設され、マンドレル5、芯金3、コア4が一体に連設され、これらとダイとの間隙は、樹脂注入孔1aから圧入された合成樹脂の樹脂通路6を形成している。コア4は下方へ行く程末広がり

の形状となつている。芯金3とダイ1は、摺動面7にて上下に摺動自在である。芯金3の上方には環状体8が一体に連設されており、その下方には一定の間隔を隔てて地面と固定された保持部材10を有し、保持部材10と環状体8との間には芯金に挿入された発条9が装着され弾着されている。

上記装置の動きを説明する。可塑化溶融された合成樹脂を押出機あるいはアキュムシリンダー（図示せず）よりアダプター2を通じて樹脂通路

6へ圧入する。コア4に至つた成樹脂は、末広がりの面を圧迫する。この力は、コア4及び芯金3を下方へ押し下げようとし、環状体8には発条9を圧縮する。圧縮してコア4の位置がダイ1より相対的に下方へ移動すると、第2図に示すようにダイとコアの間隙 t_1 が広がり t_2 、押出されるバリソンの肉厚も変化する。合成樹脂の押出が停止するとダイとコアの位置は発条9の弾性により元の位置へ復帰する。なお、マンドレル5の環状溝5aはアダプター2から圧入された合成樹脂が円周状に全体へ均等にまわるように形成するものである。

ところで、上記実施例では、コアの形状を下方へ行くにつれて末広がり状としたが、本発明を実施するにはコアの形状を下方へ行くにつれてその径を小さくするものとしても同様に機能をはたす。そしてこの場合、弾機の位置は保持部材10とマンドレル3との間に装着してダイが上方へ移動する力を弾機で規制するものである。

さらに上記実施例においては、コアの位置をダイと同じ高さにしたが、この位置をさらに高くしてスリットをなくしダイとコアとを密着させると、押出停止時に合成樹脂が垂れてくるという押出装置の欠点も改善することができる。特に粘度の低い溶融樹脂の場合に効果的である。この場合圧入される合成樹脂の圧力によりスリットが設定され、肉厚が設定される。また押出を停止するとダイとコアが密着する。

発明の効果

本発明の製造方法は、以上のように構成したので、合成樹脂の圧入速度を変化させるだけで所望の肉厚のバリソンを押出すことが可能で、成形品自体には含まれない捨てバリ部分の肉厚を容易に薄くでき原料効率の高い押出が得られるのである。

また本発明の製造装置は以上のように構成したので圧入される合成樹脂の速度を変化させるだけできわめて容易にバリソンの肉厚を制御することができ、押出装置自体もきわめて安価に形成でき、またすべての動きが機械的な制御であるので環境により装置が故障することがないのである。

図面の簡単な説明

本発明の一実施例を示すもので、第1図は押出装置の断面図、第2図はダイとコアの関係を示す

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5

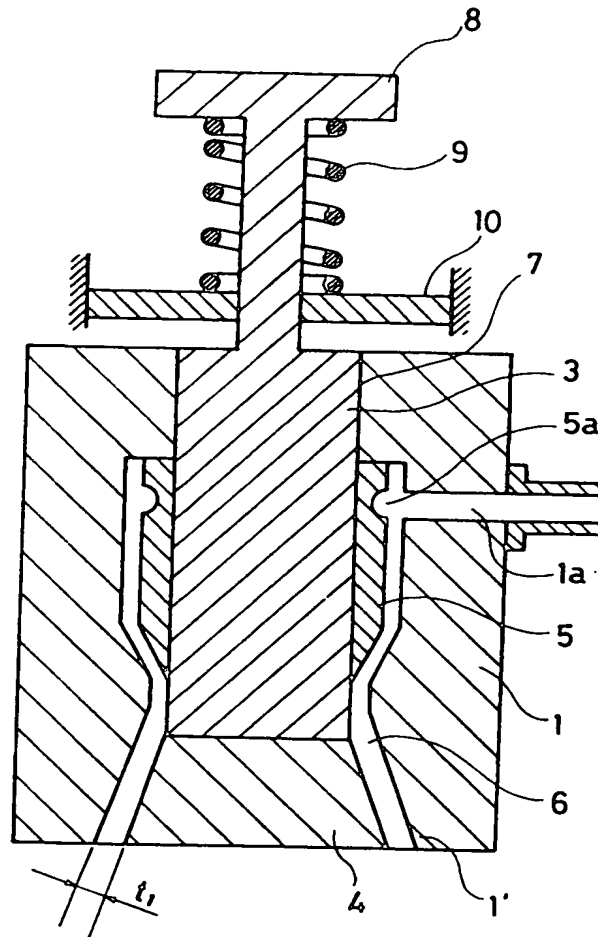
6

説明図である。

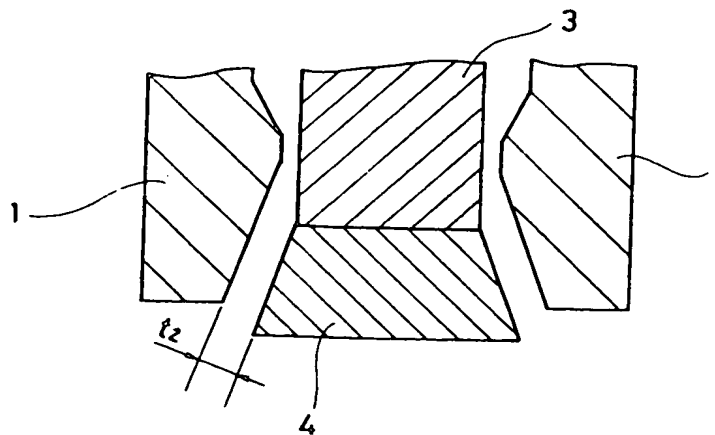
発条。

1.....ダイ、3.....芯金、4.....コア、9.....

第1図



第2図



THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑤ Int. Cl. ⑥ 日本分類
B 29 d 25 N 181
C 08 j 25 N 12
B 29 f

日本国特許庁

① 特許出願公告

昭45-36437

⑩ 特 許 公 報

④ 公告 昭和45年(1970)11月19日

発明の数 1

(全3頁)

1

2

④ 筒状発泡物の押出ダイス

① 特 願 昭42-18387

② 出 願 昭42(1967)3月23日

⑦ 発 明 者 横山彌

宝塚市米谷星乃荘82

同 井上韶久

枚方市香里ヶ丘6の30

同 福嶋信雄

茨木市桑田町2の1

同 山田利春

豊中市服部南町1の37

⑧ 出 願 人 住友化学工業株式会社

大阪市東区北浜5の15

代 表 者 長谷川周重

代 理 人 弁理士 沢浦雪男

図面の簡単な説明

図面は本発明方法を実施するに適する筒状発泡物の押出用ダイスの一例を示す縦断正面図である。

発明の詳細な説明

本発明は発泡剤を配合した熱可塑性樹脂より筒状発泡物を製造するための押出しダイスに関するものであり、さらに詳しくは発泡可能な可塑性材料の押出し流路出口部に対して空気を吹付けうるようにリップの出口全周にわたってダイス本体に空気流路をもうけてなる押出しダイスに関する。

従来、熱可塑性樹脂の発泡フィルム、発泡シート等の成形体を製造するに当たり、ポリスチレン以外の低密度発泡体には円型押出しダイスはあまり用いられていない。かかる方法で製造したポリスチレン発泡成形物は、その用途が主として湯茶のような流体を容器に向けられているので、発泡による流体の逸出を防止するために独立気泡構造の成形体が必要である。しかもポリスチレンは低温で発泡加工が行われるため、比較的ダイス金属に付着する性質が乏しく、筒状に押出されたとき

止むなく破裂する独立気泡のヒレがダイスに粘着し、押出し成形の妨げとなることは少ない。ところがポリオレフィンその他金属に粘着し易い樹脂または加工条件の場合には、このわずかなヒレも5 運転継続と共に蓄積し、操業のさまたげになることも希でない。

本発明者らは、さきにポリオレフィンの発泡組成物を円型押出ダイスより押出して液融組成物が、内圧より解放される際にはほとんど全ての気泡を破10 裂せしめて、通気構造の筒状フィルムを製造し、これを長手方向に延伸することによつて本発明者等がスプリット・ヤーンと名付けた「くもの巣状」の成形物を製造する方法を発明し、別途出願したところである。このような場合には、独立気泡は15 ダイスから離れる瞬間からその大部分が破裂するので、ヒレがリップ面に付着蓄積して著しく運転の障害となる。本発明は、多かれ少なかれ、熱可塑性樹脂発泡組成物を溶融押出しするに際して生ずる独立気泡破裂被膜のヒレがダイスリップ面に付着するのを防止せしめる装置に関するものである。すなわち、発泡剤を配合した熱可塑性樹脂を使用して発泡体フィルムを押出すダイスにおいて、押出される材料の流路出口先端の全周にわたってダイス本体に空気通路をもうけ、空気を吹きつける構造とすることによつて発泡体フィルムの連続製造を可能ならしめた押出しダイスである。

本発明装置に適用しうる合成樹脂発泡体フィルム材料は、結晶性ポリオレフィン類、それらオレフィンの相互共重合体、ポリ塩化ビニール、ポリエステル、ポリアミドなど一般の熱可塑性樹脂を指称するもので、これら発泡体フィルムは上記樹脂に発泡剤および/または発泡助剤、着色剤、安定剤などを配合添加して加熱発泡せしめたものである。本発泡体フィルム製造に使用される発泡剤は通常市販される発泡剤一般である。たとえば、アゾジカルボンアミド等のアゾ系、P・P'-オキシビスベンゼンスルホンルセミカルバジッド、トルエンスルホンルセミカルバジッド等のスルホニ

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ルセミカルバジツド系、P・P'-オキシベンゼン
スルホニルヒドラジツド等のスルフォニルヒド
ラジツド系、ジニトロソペンタメチレンテトラミ
ン等のニトロソ系の化合物または溶剤等である。

以上、上記熱可塑性樹脂および発泡剤より連続
的に良好な発泡体フィルムを得るための本発明に
よる押し出しダイスの詳細を図面について説明する。
図面は本発明押し出しダイスの実施の一例を示す縦断
正面図で、本図は円型ダイスより押し出された発泡
体フィルムの内面に対してのみ空気吹付口をもう
けたものである。

発泡剤を配合した熱可塑性樹脂は、押し出し機内で
発泡剤の分解温度より充分高い温度で熱可塑性化さ
れ、この熔融押し出し物は樹脂通路1を経て、内部ダ
イス2と調整リング3とによつて形成されたリップ
4より押し出され、筒状の独立または通気構造の
発泡体フィルム5となつて図示していない捲取り
ロールに巻き取られる。この際、リップ4の出口
の内外両面に生ずる気泡破裂被膜の付着を防止す
るための空気は、ダイス外部より空気通路6を経
て送りこまれ、リップ4の内側に同心円的に内部
ダイス2とリンク7により形成した空気吹付スリ
ット8により吹付けられる。押し出された発泡体が
独立気泡より形成されている場合は、発泡体チュ
ーブの内圧を調整するために空気出口通路9より
吹付空気を調節しながら逃がす必要がある。既述
のように本図は形成された発泡体フィルムの内面
のみより空気の吹付けを行つているが、所望によ
つては調整リンク3上に内部と同様な空気吹付ス
リット8をもうけることにより外部からの空気吹
付も可能である。本発明者等の経験によると、前
記せるスプリット・ヤーンの製造においては発泡
体フィルムを通気構造とするため、押し出された発
泡体のチューブ径がダイスの樹脂通路出口径より
小さくなる。かかる場合には内部よりの空気吹付
が必要となる。また発泡体チューブが独立気泡
より形成され、ダイス径より大きくブローアップ
される場合には外部よりの空気吹付けが必要とな
る。

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明
する。

実施例 1, 2 および 3

市販ポリプロピレンのフィルムグレード(住友
化学工業K.K.製商品名住友ノーブレンFL102、
メルトインデックス8)に対し、発泡剤アゾジカ

ルボンアミドを0.5重量%になるようにリボンブ
レンダーで常法によりドライブレンドした押し出原
料(1)、(1)の原料により製造された発泡体フィル
ムをペレット化した再成品を(1)の原料に20%添加
した押し出用原料(2)、(1)と同じ発泡剤を比重0.923、
メルトインデックス4のポリエチレンにバンバ
ーミキサー常法により混練して10重量%の発泡
剤マスターバッチを製造し、これをエチレン2.5
%をポリプロピレンにブロック共重合させたポリ
プロピレン共重合体(固有粘度1.65)に対し、発
泡剤濃度が樹脂に対して0.5重量%となるように
配合した押し出用原料(3)をそれぞれ原料とした。

これら押し出用原料を冷却マンドレルを装備した
下向きチューブラーフィルム装置(スクリーφ
40mm、L/D=22、冷却マンドレルφ95.9
mm)を使用してスクリー回転数60r.p.m.
ダイス温度205℃、巻取速度12m/minの
条件で、普通のダイス(75mmφ)と本発明によ
るダイス(75mmφ)による多孔発泡体フィル
ムの連続運転製造の比較実験を行つた。

その結果を下表に示す。

実施例	押し出用原料	使 用 ダ イ ス	可能連続 運転時間
1	ドライブレ ンド試料(1)	普通ダイ ス	40分
		空気吹付 ダイス	10時間 以上
2	再生品添加試 料(2)	普通ダイ ス	5分
		空気吹付 ダイス	10時間 以上
3	ポリエチレン マスターバツ チ試料(3)	普通ダイ ス	20分
		空気吹付 ダイス	10時間 以上

該表に示すごとく、普通使用されている円型ダ
イスを使用して発泡可能なポリプロピレン樹脂を
押し出した場合、40分程度でダイスリップ面に独
立気泡の破裂膜のヒレが付着して製品は不良品と
なつたが、本発明のダイスを使用すると、10時
間以上の連続運転を行つてもかかる現象は生じな
かつた。特にポリエチレンマスターバッチ試料ま
たは再成品を添加した試料を普通使用されている

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5

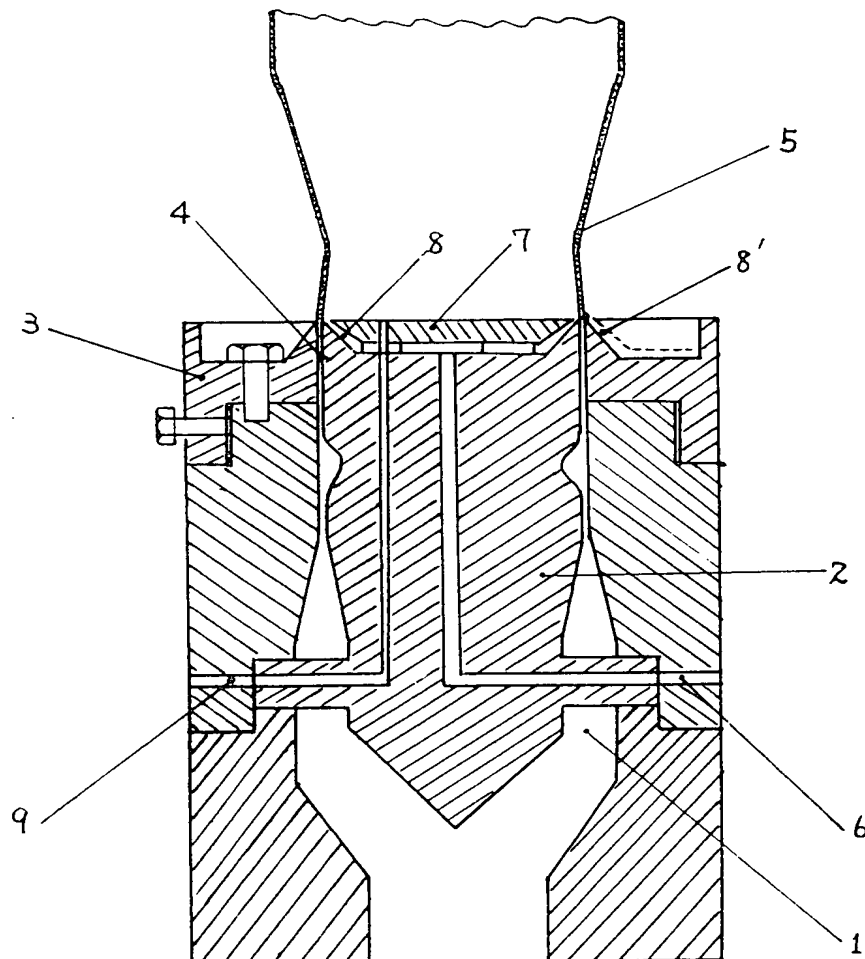
6

ダイスを使用して押出する可能連続運転時間は20分または5分であり、さらに連続運転が困難となる。しかし本発明ダイスの使用によつては充分なる連続運転が可能であつた。

特許請求の範囲

1 発泡剤を配合した熱可塑性樹脂を押出す円型

ダイスにおいて、ダイスリップ4の出口端の全周にわたつてダイス本体に空気通路6を設け、その先端をリップ4の内または外または両側に同心円的に空気吹付スリット8（または8'または8および8'）を設けてなる筒状発泡物押出ダイス。



THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

09/142613

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
DOCUMENT TRANSMITTED

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

07 January 1999 (07.01.99)

International application No.

PCT/JP97/00804

International filing date (day/month/year)

13 March 1997 (13.03.97)

Applicant

MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION et al

The International Bureau transmits herewith the following documents and number thereof:

_____ copy of the English translation of the international preliminary examination report (Article 36(3)(a))

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

K. Takeda

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 18 September 1997 (18.09.97)	
International application No.: PCT/JP97/00804	Applicant's or agent's file reference: 97021PCOP551
International filing date: 13 March 1997 (13.03.97)	Priority date: 13 March 1996 (13.03.96)
Applicant: ISHIGURO, Koichi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:13 March 1997 (13.03.97)☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00804

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ G01N33/53, C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926 - 1996
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971 - 1996
Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994 - 1997

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 89 (1992) B. Lichtenberg-Kraag "Phosphorylation-dependent epitopes of neurofilament antibodies on tau protein and relationship with Alzheimer tau" p. 5384-5388 ABSTRACT	1 - 7
X	Neurobiology of Aging, Vol. 16, No. 3 (1995) R. Nuydens "Neuronal Kinase Stimulation Leads to Aberrant Tau Phosphorylation and Neurotoxicity" p. 465-477 ABSTRACT	1 - 7
X	Biochemical Journal, Vol. 301 (1994) M. Goedert "Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease" p. 871-877 ABSTRACT	1 - 7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

March 27, 1997 (27. 03. 97)

Date of mailing of the international search report

April 8, 1997 (08. 04. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ G01N33/53, C07K16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-1996年

日本国登録実用新案公報 1994-1997年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Proc. Natl. Acad. Sci., 第89巻(1992) B. Lichtenberg-Kraag "Phosphorylation-dependent epitopes of neurofilament antibodies on tau protein and relationship with Alzheimer tau" p5384-5388 ABSTRACT	1-7
X	Neurobiology of Aging, 第16巻第3号 (1995) R. Nuydens "Neuronal Kinase Stimulation Leads to Aberrant Tau Phosphorylation and Neurotoxicity" p465-477 ABSTRACT	1-7
X	Biochemical Journal, 第301巻 (1994) M. Goedert "Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease" p871-877 ABSTRACT	1-7

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27.03.97

国際調査報告の発送日

08.04.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区蔵が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村祥子

2 J

9408

電話番号 03-3581-1101 内線3252



THIS PAGE BLANK (USPTO)